



**Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales**  
**Doctorado de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales**

Tesis Doctoral

**INFLUENCIA DE DIFERENTES INTENSIDADES DE PASTOREO,  
ESTRÉS HÍDRICO Y CONTENIDO DE NUTRIENTES SOBRE LOS  
MICROORGANISMOS DEL SUELO EN PATAGONIA SUR**

Doctorando

Ingeniero Agrónomo Santiago, Toledo

Directores

Dr. Pablo Luis, Peri

Dra. Sonia, Fontenla

Asesor Académico Dr. Juan Manuel, Cellini

Jurado evaluador

Dra. Silvina, Vargas Gil

Dr. Mario, Saparrat

Dr. Jorge, Angelini

2020

*Le dedico esta tesis a mi abuela que me acompaña desde  
el cielo y a mi familia...*

*Una vez más, el esfuerzo y la perseverancia permiten  
alcanzar las metas propuestas en la vida, dejando  
en su paso muchos cambios, esfuerzos, sacrificios  
y sobre todo un gran aprendizaje.*

## **Agradecimientos**

Agradecido a la una política de educación pública y gratuita de este país que me sigue permitiendo acceder a mis estudios. Al CONICET por brindarme la posibilidad de tener una beca doctoral y hacer posible la realización de esta tesis y doctorado de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales de la Universidad Nacional de la Plata (UNLP), con la asesoría académica del Dr. Juan Manuel Cellini quien me acompañó en este tiempo. También al jurado evaluador por sus comentarios y aportes que realzaron la calidad de esta tesis.

A Pablo Peri por dirigirme en esta tesis, pero principalmente su paciencia a pesar de mis errores, por sus tiempos de fin de semanas dedicados para poder concluir con esta tesis, por enseñarme y sobre todo por estar siempre presente.

A quienes me ayudaron y colaboraron, sea con mucho o poco de su tiempo durante el transitar de esta tesis. Contando con su apoyo desde un simple compartir de mates, anécdotas y risas, en una o varias de las tantas salidas de campo que involucro la tesis y para las personas que me ayudaron en las horas y horas de laboratorio que requirió este estudio. Gracias: Leonardo Huertas, Verónica Gargaglione, Francisco Mattenet, Sebastian Ormanachea, Cristian Morales, Jorge Birgi, Leandro Almonacid, Lourdes Senosiain, María Bahamonde, Romina Lasagno, Hector Haro, Ivana Fannin, Guillermo Toledo, Héctor Bahamonde, Ricardo Bonil, Sandra Duarte, Veronica Bella, Miguel Andrade.

A mi codirectora Sonia Fontenla por su amabilidad y buena predisposición para enseñarme sobre micorrizas y brindar su conocimiento y sus aportes para fortalecer esta tesis.

A mi familia, quienes me enseñan con el ejemplo, y a quienes admiro por la humildad de persona que me han transmitido.

A Claudia mi compañera de la vida, por estar siempre, y por sobre todo su paciencia, cariño, comprensión, siendo mi fortaleza en los momentos más difíciles en esta etapa.

Al grupo FAMA de INTA, por hacerme sentir parte del grupo desde un primer momento, por sus consejos y por el compañerismo de trabajo en equipo.

Al INTA Río gallego Santa Cruz por brindarme las instalaciones, movilidad y equipamiento necesario para la realización de los estudios que se encuentran en esta tesis, y a todo el personal de la EEA INTA Santa Cruz por compartir día a día el trabajo cotidiano.

A la Universidad Nacional de la Patagonia Austral por el uso de los laboratorios y parte del financiamiento de la tesis.

A los laboratorios de Microbiología Aplicada y Biotecnología del Centro Regional Universitario Bariloche de la Universidad Nacional del Comahue y al grupo de trabajo de mi codirectora Sonia Fontenla; también al laboratorio de Microbiología Agrícola de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad de Buenos Aires y al equipo de trabajo de Olga Correa, en ambos laboratorio se realizaron parte de los análisis de la tesis.

Muchas gracias a todos/as  
Santiago

## RESUMEN

Los pastizales naturales de Patagonia Sur Argentina (Santa Cruz), son un recurso natural importante para la producción ganadera ovina. La interacción entre el pastoreo y las variaciones climáticas (principalmente la precipitación producto del cambio climático) incide sobre la productividad del ecosistema, la composición de especies y el suelo. Son escasos los antecedentes en los ecosistemas de Santa Cruz sobre los microorganismos del suelo. El objetivo general de la presente tesis fue estudiar la influencia de los diferentes usos históricos ganaderos y condiciones ambientales en ecosistemas áridos y semiáridos de Patagonia Sur sobre grupos de microorganismos asociados al suelo y a las plantas; y analizar experimentalmente aspectos particulares de los aporte de nutrientes, condiciones de sequía y frecuencias de defoliación sobre las comunidades de microorganismos del suelo. Se abordó el impacto de las cargas ganaderas contrastantes de largo plazo (moderada vs alta) en distintas áreas ecológicas de Patagonia Sur, abarcando un gradiente ambiental de precipitación, y de diferentes comunidades vegetales y características edáficas sobre los parámetros microbiológicos del suelo. Para cumplimentar con los objetivos, se abordó experimentalmente los impactos que generarían el cambio climático (sequías) y los aportes de nutrientes minerales en pastizales de la Estepa Magallánica Seca sobre las comunidades de microorganismos del suelo. Por último, se evaluó la respuesta de los hongos micorrícicos arbusculares a diferentes frecuencias de defoliación en raíces de *Rhizosperma virescens*. Los principales resultados muestran que los sitios con mayores precipitaciones y cobertura vegetal determinaron un aumento en los parámetros microbiológicos del suelo (carbono de la biomasa microbiana, respiración biológica del suelo y hongos totales de suelo), esto también fue confirmado en el tratamiento de riego del ensayo experimental de manipulación de la precipitación. En el caso particular del área ecológica matorral de mata negra se demostró el efecto positivo del micrositio canopeo del arbusto *Mulguraea tridens* (mayor materia orgánica y nutrientes) en comparación a los suelos del interparche que incrementaron los valores de los parámetros biológicos. En este sentido, también en el ensayo de fertilización en pastizales de la estepa magallánica seca se generó un efecto positivo sobre el carbono de la biomasa microbiana que dependió de los nutrientes aportados al suelo y un efecto negativo en la respiración biológica del suelo. Además, los datos de esta tesis mostraron que la colonización de hongos micorrícicos arbusculares fue intrínseca de las especies de plantas vegetales (herbáceas-subarbustos y arbustos)

de cada área ecológica, determinándose que *Poa duseinii*, *R. virescens*, *Festuca gracillima*, *Nardophyllum bryoides*, *M. tridens* fueron hospedadoras de hongos micorrícicos arbusculares, excepto *Carex argentina*. Las altas cargas ganaderas ovinas afectaron negativamente los parámetros microbiológicos del suelo, asociados a una disminución de la cobertura vegetal y a la pérdida de carbono del suelo. El efecto de la carga ganadera sobre la colonización de hongos micorrícicos arbusculares, dependió de la preferencia y selectividad del consumo que ejercen las ovejas sobre las especies de plantas, donde la simbiosis en las raíces de *P. duseinii* y *R. virescens* fueron negativamente afectada por las altas cargas ganaderas. Las interacciones entre las cargas ganaderas y las áreas ecológicas determinaron respuestas diferenciales sobre los microorganismos del suelo y los hongos micorrícicos arbusculares, principalmente dadas por las características de las condiciones climáticas, de vegetación y características del suelo de cada sitio. Experimentalmente se demostró que una frecuencia de defoliación con intervalos de 21 días disminuyó la colonización de hongos micorrícicos arbusculares, comparado con las plantas sometidas a una baja frecuencia de defoliación (intervalos entre cortes mayores a 50 días). Esto evidenció la importancia del tiempo de descanso y/o de recuperación, hecho que permitiría que la planta recupere tejido fotosintético y así mantener la colonización de los hongos micorrícicos arbusculares en sus raíces. Esta tesis complementa la falta de información sobre estudios de microbiología del suelo en los ecosistemas Australes de la Patagonia, permitiendo conocer, analizar y caracterizar a estos ambientes desde una perspectiva de la biología del suelo. La información obtenida toma relevancia dado que las comunidades de microorganismos participan en muchos procesos y funciones del ecosistema, que a la vez repercuten en la productividad de los pastizales, y en consecuencia en la producción ganadera. Asimismo, estos parámetros biológicos del suelo podrían ser utilizados como una herramienta de bio-monitores en estos ambientes bajo sistemas de pastoreo o frente al cambio climático, ya que son sensibles a cambios físicos o químicos de suelo.

## ABSTRACT

The natural grasslands of Southern Patagonia Argentina (Santa Cruz) are important for sheep production. Interactions between grazing and climatic variation (mainly rainfall resulting from climate change) influence ecosystem productivity, plant species compositions and soil. However, there was no antecedents related to soil microorganisms in ecosystems of Santa Cruz province. Therefore, the objectives of this thesis were to study the impact of long-term stocking rate (moderate vs high) in different ecological areas of Southern Patagonia, across an environmental gradient of precipitation with different plant communities and edaphic characteristics that influence soil microbiological parameters. In addition, experiments were set up to evaluate the impacts of climate change (drought) and mineral nutrients in Dry Magellanic steppe (DMS) grasslands on communities of soil microorganisms. Finally, the response of AM at different defoliation frequencies in the *Rhizodermis virescens* was evaluated. The main results showed that sites with higher rainfall and greater vegetation cover determined an increase in soil microbiological parameters (microbial biomass carbon-(MBC), soil biological respiration-(SBR), and total soil fungi), which also was confirmed in the irrigation treatment of the manipulated water experiment. Particularly, in the mata negra thicket ecological areas it was demonstrated the positive effect of canopy microsite of the *Mulguraea tridens* shrub (higher levels of organic matter and nutrients) compared to intercanopy soils that increased values of soil biological parameters. Also, in the fertilization experiment at DMS grassland there was a positive effect on MBC that depended on nutrients addition into soil and a negative effect on SBR. Furthermore, the data of this thesis showed that AM colonization was intrinsic of plant species (herbaceous-subshrubs and shrubs) in each ecological area, where roots of *Poa duseii*, *R. virescens*, *Festuca gracillima*, *Nardophyllum bryoides*, *M. tridens* were hosted of AM, except *Carex argentina*. High sheep stocking rates affected negatively the soil microbiological parameters due to a decrease in plant cover and loss of soil carbon. The effect of stocking rate on AM colonization depended on sheep preference and selectivity on the most palatable plant species, where symbiosis in roots of *P. duseii* and *R. virescens* were the most negatively affected by high sheep stocking rates. Interactions between stocking rates and ecological areas determined differential responses on soil microorganisms and AM given by the climatic conditions, vegetation and soil characteristics of each site. Defoliation frequency with intervals of 21 days decreased AM colonization compared with plants under low defoliation frequency (cut

intervals greater than 50 days). This determined the importance of recovery time that allows plants to recover photosynthetic tissue and then to maintain the colonization of AM in roots. This thesis provides information on soil microbiology in Southern Patagonia ecosystems that improves the knowledge, analyzes and characteristics of these environments from a soil biology perspective. The obtained information is considered relevant since microorganisms communities participate in many ecosystem processes and functions that in turn affect grasslands productivity, and consequently livestock production. Also, the soil biological parameters can be used as bio-monitors in these environments under grazing systems or under climate change conditions, since they are sensitive to soil physical or chemical changes.

## **PUBLICACIONES DERIVADAS DE ESTA TESIS DOCTORAL**

### **Trabajos en revistas científicas con referato**

Toledo, Santiago; Peri, Pablo L.; Correa, Olga S.; Gargaglione, Verónica; Gonzalez-Polo Marina. (2021). SOIL MICROBIAL COMMUNITIES RESPOND TO AN ENVIRONMENTAL GRADIENT OF GRAZING INTENSITY IN SOUTH PATAGONIA ARGENTINA. Journal of Arid Environments, 184, 104300. (<https://doi.org/10.1016/j.jaridenv.2020.104300>).

### **Otras publicaciones**

Toledo, Santiago. (2019). Microbiología del suelo en diferentes ecosistemas de la Patagonia Austral y los efectos del manejo antrópico. Actividad de divulgación organizado por la secretaria de extensión de la unidad académica de Río Gallegos de la UNPA.

Toledo, Santiago. (2019). Tesis en 2 minutos. Actividad de divulgación de las actividades de investigación desarrolladas en el marco de la tesis doctoral organizado por la dirección de sistemas de información, comunicación y procesos del INTA.

Toledo, S. Peri, P.L., Gargaglione, V., Toledo, G. (2018). Primeros antecedentes de micorrizas en suelos de Santa Cruz influenciadas por diferentes intensidades de pastoreo. I Jornada Patagónicas de ciencias del ambiente y recursos naturales, octubre de 2018, Río Gallegos, Santa Cruz, aprobada por consejo de unidad N°377/18.

Toledo, G., Gargaglione, V., Peri, P.L., Toledo, S. (2018). Contenido de biomasa microbiana en los suelos de estepa de Santa Cruz y su variación en función al régimen hídrico. 5° encuentro de investigadores, becarios y tesis de la Patagonia Austral. Realizado en la UNPA en octubre de 2018, Río Gallegos - Santa Cruz.

Toledo S.; Gargaglione V.; Montecchia M.; Fontenla S.; Correa O.; Peri P.L. (2017). Efecto de la carga ganadera sobre la biomasa microbiana del suelo en la Estepa Magallánica Seca de Santa Cruz. Actas XI Reunión Nacional Científico Técnico de Biología de Suelos (REBIOS), pp. 53. 25-27 Octubre 2017, Corrientes.



## ÍNDICE GENERAL

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
1.1. El ecosistema Patagónico.....	2
1.2. Importancia de los microorganismos en la funcionalidad del ecosistema.....	3
1.3. Factores que afectan a los microorganismos del suelo en los ecosistemas.....	7
1.3.1. Gradiente ambiental asociados al clima y la vegetación.....	7
1.3.2. Efectos del pastoreo sobre los microorganismos del suelo.....	9
1.3.3. Efectos del estado hídrico del suelo sobre los microorganismos.....	12
1.3.4. Efectos de los nutrientes del suelo sobre los microorganismos.....	13
1.4. Objetivos e Hipótesis de trabajo de la tesis.....	15
1.5. Organización de la tesis.....	17
CAPÍTULO 2. LAS COMUNIDADES MICROBIANAS DEL SUELO RESPONDEN AL GRADIENTE AMBIENTAL Y AL PASTOREO OVINO EN PATAGONIA SUR ARGENTINA.....	19
2.1. Introducción.....	20
2.2. Materiales y métodos.....	23
2.2.1. Sitios de estudio.....	23
2.2.2. Características climáticas, vegetación y suelo de los sitios.....	26
2.2.3. Microbiología del suelo.....	28
2.2.3.1. Carbono de la biomasa microbiana.....	28
2.2.3.2. Determinación de la abundancia de hongos y bacterias totales por qPCR...29	
2.2.3.3 Respiración potencial del suelo y coeficientes ecofisiológicos microbianos...30	
2.2.4. Análisis estadístico.....	30
2.3. Resultados.....	31
2.3.1. Carbono de la Biomasa Microbiana (C-BM) y abundancia de hongos y bacterias en ambientes de Patagonia Sur.....	31
2.3.2. Interacciones entre factores sobre la respuesta del C-BM, hongos y bacterias.33	
2.3.3. Respiración Biológica de suelo (RBS), Coeficiente Metabólico ( $qCO_2$ ) y Cociente Microbiano de suelo ( $qM$ ) en los ambientes de Patagonia Sur.....	35
2.3.4. Interacciones entre factores en la respuesta de la RBS, $qCO_2$ y $qM$ .....	35
2.3.5. Relaciones de las variables microbiológicas con las ambientales, suelos y vegetación.....	37
2.3.6. Microbiología del suelo en los micrositios del MMN.....	38
2.4. Discusión.....	40
2.4.1. Carbono de la Biomasa Microbiana (C-BM).....	41
2.4.2. Abundancia de hongos y bacterias.....	44
2.4.3. Respiración biológica del suelo (RBS).....	47
2.4.4. Coeficientes ecofisiológicos microbianos.....	49
2.4.5. Los micrositios del arbusto <i>Mulguraea tridens</i> y las variables microbiológicas.50	
2.5. Conclusión.....	53
CAPÍTULO 3. HONGOS FORMADORES DE MICORRIZAS ARBUSCULARES ASOCIADAS A PLANTAS EN ÁREAS ECOLÓGICAS DE LA PATAGONIA SUR QUE CONTRASTAN CARGAS GANADERAS OVINAS.....	54
3.1. Introducción.....	55
3.2. Materiales y métodos.....	58

3.2.1. Sitios de estudio.....	58
3.2.2. Muestreo de plantas.....	58
3.2.3. Tinción y cuantificación de MA.....	59
3.2.4. Características de suelo.....	60
3.2.5. Análisis estadístico.....	61
3.3. Resultados.....	62
3.3.1. Micorrizas arbusculares en los ecosistemas de Patagonia Austral.....	62
3.3.2. Relaciones entre la colonización MA y las variables de suelo.....	64
3.3.3 Las MA y los efectos del pastoreo a nivel de las áreas ecológicas y sobre las especies de plantas.....	65
3.4. Discusión.....	68
3. 4. 1. Micorrizas en los ecosistemas de Patagonia Austral.....	68
3. 4. 2. Micorrizas y la respuesta al pastoreo.....	74
3.5. Conclusión.....	77

#### CAPÍTULO 4. INFLUENCIA DE LA FERTILIZACIÓN Y EL ESTADO HÍDRICO DEL SUELO SOBRE LA MICROBIOTA EDÁFICA EN ECOSISTEMAS DE PATAGONIA SUR .....78

4.1. Introducción.....	79
4.2. Materiales y métodos.....	81
4.2.1. Sitios de estudio.....	81
4.2.2. Características del sitio de estudio.....	81
4.2.3. Ensayo de variación de la precipitación (sequía y riego).....	82
4.2.4. Ensayo de nutrientes.....	83
4.2.5. Determinación de las variables de precipitación, temperatura y biomasa área vegetal durante los periodos del estudio (2015-2017).....	85
4.2.6. Microbiología del suelo.....	85
4.2.7. Análisis estadístico.....	86
4.3. Resultados.....	86
4.3.1 Precipitaciones y temperaturas en el sitio del estudio.....	86
4.3.2. Ensayo de Nutrientes.....	87
4.3.2.1. Biomasa aérea vegetal.....	87
4.3.2. 2 Microbiología del suelo.....	88
4.3.2.3 Relaciones entre las variables microbiológicas y la biomasa vegetal.....	88
4.3.3. Ensayo de variación de la precipitación.....	90
4.3.3.1. Biomasa aérea vegetal.....	90
4.3.3.2. Microbiología del suelo.....	91
4.3.3.3. Relaciones entre las variables microbiológicas de suelo, la biomasa y agua aportada al suelo.....	92
4.4. Discusión.....	94
4.4.1. Biomasa vegetal y variables microbiológicas en el ensayo de nutrientes.....	94
4. 4.2. Biomasa vegetal y variables microbiológicas en el ensayo de variación de la precipitación.....	98
4.5. Conclusión.....	103

#### CAPÍTULO 5. EFECTO DE LA FRECUENCIA DE DEFOLIACIÓN SOBRE LAS PLANTAS DE *RYTIDOSPERMA VIRESCENS* Y LA COLONIZACIÓN DE HONGOS MICORRÍDICOS ARBUSCULARES.....104

5.1. Introducción.....	105
5.2. Materiales y métodos.....	107
5.2.1. Ensayo de campo.....	108
5.2.2. Ensayo de invernadero .....	108
5.2.3. Tratamientos de frecuencia de defoliación.....	109
5.2.4. Características de las plantas seleccionadas y del suelo del sitio EMS para los ensayos.....	110
5.2.5. Mediciones de las características ambientales.....	111
5.2.6. Mediciones en plantas.....	111
5.2.7. Micorrizas arbusculares.....	112
5.2.8. Análisis estadístico.....	113
5.3. Resultados.....	114
5.3.1. Temperatura y humedad de suelo registradas para los ensayos.....	114
5.3.2. Respuesta de las plantas de <i>R. virescens</i> a la frecuencia de defoliación.....	114
5.3.3. Micorrizas arbusculares y la defoliación en las plantas de <i>R. virescens</i> .....	117
5.3.4. Relación entre la micorrización MA y las variables de crecimiento de las plantas de <i>R. virescens</i> .....	119
5.4. Discusión.....	121
5.4.1. Respuestas de las plantas a la frecuencia de defoliación.....	121
5.4.2. Efecto de la frecuencia de defoliación sobre las micorrizas.....	124
5.4.3. Efecto de la frecuencia de defoliación interactuando con el ambiente sobre las micorrizas.....	126
5.4.4. Relación entre la respuesta de las plantas y las micorrizas.....	129
5. 5. Conclusión.....	130
 CAPÍTULO 6. DISCUSIÓN GENERAL.....	 131
6.1. Comunidades de microorganismos del suelo en el gradiente ambiental de la Patagonia Sur.....	134
6.2. Microorganismos del suelo en relación a la fertilización mineral - sequía y riego en ambientes de Patagonia Sur.....	136
6.3. Comunidades de microorganismos y los efectos del pastoreo.....	139
6.4. Aplicabilidad de los resultados del presente estudio y posibles líneas de investigación futuras.....	143
6.5. Conclusiones alcanzadas de la tesis y sus perspectivas.....	146
 BIBLIOGRAFÍAS.....	 148

## **Capítulo 1**

### **INTRODUCCIÓN GENERAL**

### 1.1. El ecosistema Patagónico

En Patagonia Sur argentina, Santa Cruz cuenta con una superficie de 243.943 km<sup>2</sup> y se extiende desde las latitudes 46° a 52°S. La mayor parte es caracterizada como una región árida-semiárida, de clima templado frío (media anual entre 5.5 y 8°C), con precipitaciones que varían de 400 a 150 mm año<sup>-1</sup> en un gradiente este – oeste, y vientos predominantes del sector oeste con intensidades de moderados a fuertes (Peri *et al.*, 2013; González, 2013). En estos ambientes el 85% de la superficie está formada por estepas de gramíneas y arbustos, caracterizada principalmente por la presencia de coirones (*Festuca*, *Stipa*), pastos cortos (*Poa*, *Carex*) y arbustos (*Berberis*, *Mulguraea*) (Cibils y Borrelli, 2005; Peri *et al.*, 2013).

La ganadería ovina extensiva es la principal actividad de Santa Cruz con 2.770.000 cabezas (SENASA, 2017), de la cual se obtiene como productos principales la lana crusa fina y la carne de cordero. En esta región los sistemas ganaderos mayoritariamente se caracterizan por el pastoreo continuo en grandes extensiones de pastizal natural (Golluscio *et al.*, 1998; Ormaechea y Peri, 2015). Además, actualmente existe aproximadamente 15% de los establecimientos de Santa Cruz que aplican otras alternativas del manejo del pastizal que tienden a un uso más homogéneo de los cuadros, como el pastoreo rotativo estacional (veranada-invernada), el pastoreo rotativo propiamente dicho (los cuadros se usan más de una vez al año) y los que involucran un manejo del pastoreo holístico (Ormaechea *et al.*, 2019). En este sentido, en Patagonia Sur, el uso de los ambientes por parte de los ovinos es generalmente heterogéneo, con escasez de apotreramientos, y cargas animales que varían desde 0,13 a 1,2 cabezas ha<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup> según las áreas ecológicas y la intensidad de uso (Golluscio *et al.*, 1998; Cibils *et al.*, 2001; Peri *et al.*, 2013). Como resultado de una combinación de sobrepastoreo y sequía, más de 6,5 millones de hectáreas fueron afectadas por un proceso de degradación de la estepa (desertificación) (Del Valle *et al.*, 1995; Mazzonia y Vazquez, 2009), donde la producción anual de los pastizales no supera los 40 Kg de materia seca ha<sup>-1</sup>. Asimismo, se ha informado que una alta intensidad de pastoreo continuo en estos pastizales tiene efectos negativos en los niveles de carbono (C) en el suelo, asociados a variables climáticas, el tipo de vegetación y procesos de erosión del suelo (Peri, 2011; Peri *et al.*, 2016).

Los ecosistemas áridos y semiáridos presentan una variabilidad intrínseca en las precipitaciones, siendo un factor clave en la estructura y función de estos ecosistemas

(Golluscio *et al.*, 1998; Austin *et al.*, 2004; González, 2013). En este sentido, en el marco de los escenarios futuros de cambio climático, se predice para la región de Patagonia Sur variaciones en los patrones de precipitaciones con aumentos en las frecuencias de eventos climáticos extremos, como sequías y lluvias torrenciales, acompañados de un aumento de las temperaturas de 2 a 3°C para el año 2080 (Kreps *et al.*, 2012; IPCC 2013). Esto determinaría cambios a nivel del ecosistema, lo cual tendría implicancias sobre el ambiente edáfico, plantas y consecuentemente a nivel productivo.

Por otra parte, estos ambientes áridos de la Patagonia Sur presentan limitación de nutrientes en el suelo (principalmente N) dependiendo de las comunidades vegetales, precipitaciones y temperaturas (Peri *et al.*, 2019). Ciertamente, los nutrientes del suelo mantienen funciones ecológicas claves, como la productividad primaria de las plantas y las comunidades de microorganismos para el funcionamiento del suelo.

Sin embargo, en estos ecosistemas Australes de la Patagonia no se han abordado estudios de microbiología del suelo que permitan conocer y caracterizar a estos ambientes desde una perspectiva de la biología del suelo. Las comunidades de microorganismos intervienen en muchos procesos y funciones del suelo, que a la vez repercuten en la productividad de los pastizales, y en consecuencia en la producción ganadera. Por lo tanto, el presente estudio pretende completar esta falta de información a través de la determinación de parámetros microbiológicos del suelo como el carbono de la biomasa microbiana, la respiración biológica del suelo, la abundancia de bacterias y hongos totales de suelo, como así también las micorrizas arbusculares o los coeficientes eco-fisiológicos en diferentes ecosistemas de Patagonia bajo manejos de carga animal, y en un gradiente climático. Además, estos parámetros biológicos del suelo pueden ser utilizados como una herramienta de bio-monitores en estos ambientes bajo sistemas de pastoreo o frente al cambio climático, ya que son más sensibles a cambios respecto a parámetros físicos o químicos de suelo.

## **1.2. Importancia de los microorganismos en la funcionalidad del ecosistema**

Se considera que el suelo es un recurso natural que depende de las propiedades químicas, físicas y biológicas (Jenny, 1980). En los ambientes de Patagonia Sur, se ha demostrado que la conservación del carbono orgánico del suelo en estos pastizales permite mantener la producción y su biodiversidad (Peri *et al.*, 2018). Sin embargo, es

importante destacar la relevancia de los microorganismos en la calidad del suelo y, por tanto, en su conservación y mantenimiento. Las comunidades de microorganismos del suelo, juega un rol central en los procesos que permiten mantener la disponibilidad de nutrientes, mineralización de la materia orgánica, ciclado de los nutrientes y la humificación (Franzluebbers *et al.*, 1995; Emmerling *et al.*, 2002). Buscot y Varma (2005) informaron que los microorganismos favorecen la formación de agregados en el suelo, promueven el crecimiento vegetal y la resistencia a los procesos de erosión en los ecosistemas. Es por ello, que la actividad de los microorganismos en el suelo es, no sólo, un factor clave en la fertilidad del suelo, sino que también en la estabilidad y funcionamiento de los ecosistemas naturales y en los agro-ecosistemas (Trasar *et al.*, 2000). Las propiedades edáficas, pueden ser afectadas por procesos de degradación provocados por fenómenos naturales o por las actividades antrópicas, en donde la fertilidad de los suelos estará determinada por complejas interacciones bióticas entre los microorganismos que lo componen y las plantas y/o animales (Jenny, 1980; Franzluebbers *et al.*, 2001; Buscot y Varma, 2005; Sylvia *et al.*, 2005).

Ciertamente, la descomposición de la materia orgánica es un proceso en los ecosistemas mediado por microorganismos heterótrofos que utilizan el material muerto o detritus como hábitat, fuente de energía y carbono (Laskowski *et al.* 1995; Chapin *et al.*, 2002; Menyailo *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2013; Zhao *et al.*, 2016). La respiración metabólica de los microorganismos asociados al detritus orgánico es el proceso que libera carbono a la atmosfera en forma de CO<sub>2</sub> (Paul y Clark, 1989). Es por ello, que la tasa de respiración se utiliza como un estimador de la tasa de descomposición en los ecosistemas terrestres (Wagener y Schimel, 1998; Liu *et al.*, 2009; Moinet *et al.*, 2016). Es decir, la respiración basal es una medida de la actividad microbiana y la tasa de descomposición de la materia orgánica del suelo (Saviozzi *et al.*, 2001; Zhao *et al.*, 2016). En este sentido, Brookes (1995) describe que la actividad microbiana es un parámetro que responde rápidamente a los cambios provocados por el ambiente y las prácticas de manejo del suelo. Por lo tanto, el componente biológico del suelo puede ser considerado como un “alerta” temprana para evitar un daño irreversible en el suelo (García Izquierdo *et al.*, 2003).

El carbono contenido en la biomasa microbiana del suelo (C-BM) ha sido utilizado como un indicador de cambios ocurridos en el ambiente edáfico producto de la aplicación de diferentes sistemas de manejo agropecuario, dado que resulta ser un indicador del impacto del sistema sobre los niveles de materia orgánica del suelo, y

mucho más importante aún, sobre la calidad de la materia orgánica como sustrato (Jenkinson, 1988; Bending *et al.*, 2000). Los nutrientes que puede contener un suelo se asocia con el C-BM, ya que la biomasa microbiana representa un 1-4 % del carbono orgánico del suelo (Sparling, 1992). Estas estimaciones se derivan dado que el carbono, el nitrógeno y el fósforo que son elementos esenciales en la conformación de la estructura celular de los microorganismos (Anderson y Domsch, 1986; Sparling, 1992). Una disminución de los niveles de biomasa microbiana del suelo, podría afectar el ciclaje de nutrientes y su disponibilidad en el suelo, y en consecuencia disminuir la productividad primaria de las plantas (Jobbágy *et al.*, 2002; Landgraf y Klose, 2002; Goberna *et al.*, 2007).

La rizósfera (volumen de suelo inmediatamente próximo a la raíz) está directamente influenciado por la actividad fisiológica de las plantas y se caracteriza por poseer menor pH, potencial agua y concentración de carbohidratos solubles (Garbaye, 1991; Andrade *et al.*, 1997; Liasu y Shosanya, 2007). En general se estima que el número de microorganismos por gramo de suelo sea aproximadamente el doble en la rizósfera comparado con otras fracciones del suelo (Garbaye, 1991). Las comunidades microbianas de hongos y bacterias del suelo están influenciadas por la cantidad y calidad de los recursos que ingresan al suelo, ya sea como detritus de las plantas o como rizo-deposición (Kent y Triplett, 2002; Bais *et al.*, 2006; Fierer y Jackson, 2006; Dennis *et al.*, 2010; Lange *et al.*, 2015). Muchas veces, la composición de la comunidad microbiana es diferente en cuanto a la eficiencia del uso de los recursos, lo que podría tener implicancias a nivel del ecosistema suelo y principalmente sobre el carbono orgánico del suelo (Lipson *et al.*, 2009; Keiblinger *et al.*, 2010). En este sentido, la composición de estas poblaciones microbianas varía entre especies de plantas debido a los diferentes perfiles de metabolitos que se liberan en el suelo (Kent y Triplett, 2002; Godley, 2004; Bais *et al.*, 2006; Althabegoiti *et al.*, 2007; Ren *et al.*, 2017).

Los microorganismos poseen diversas interrelaciones, entre las que se encuentran sinergismo, antagonismos, neutralismos y simbiosis. Una de las interacciones simbióticas más conocidas en el suelo entre las raíces de las plantas y ciertos hongos es la denominada micorriza. En general, se estima que el 90% de las plantas vasculares están micorizadas y alrededor del 80% forman micorrizas arbusculares (MA) (Smith y Read, 2008). La micorriza es una asociación simbiótica esencial entre un hongo y la raíz de las plantas, donde los hongos se benefician de las plantas



hospedadoras por ser biótrofos obligados dependientes del carbono como fuente de energía aportados por las plantas (Snellgrove *et al.*, 1982; Smith y Read, 1997, 2008; Brundrett, 2004; Tedersoo *et al.*, 2020). Actualmente, se reconoce que las micorrizas favorecen la supervivencia de las plantas en los ecosistemas, al determinar una mejora en la nutrición por aumentar la absorción de los nutrientes, e incrementan la tolerancia a distintos tipos de estrés, tanto bióticos como abióticos y contribuyen a la formación del suelo (Francis y Read, 1995; Zobel *et al.*, 1997; Brundrett, 2004; Smith y Read, 2008). Las asociaciones entre las plantas y las micorrizas son de naturaleza compleja, formando en el suelo redes de hifas fúngicas interconectadas entre sí y que conectan los sistemas radicales de las plantas (inclusive taxones y formas de vida distintos) que contribuyen a regular el flujo de nutrientes y las interacciones competitivas inter e intra-específicas de las plantas contribuyendo de esta manera en la ecología de los ecosistemas (Tedersoo *et al.*, 2020). Algunos autores definen una nueva fracción de suelo llamada “micorrizosfera” (Garbaye, 1991; Andrade *et al.*, 1997; Liasu y Shosanya, 2007), que representa la región de influencia de las raíces micorrizadas.

Los microorganismos en el suelo coexisten en las mismas fracciones del suelo sean estas definidas como rizosfera o micorrizosfera, e interaccionan en varios procesos del suelo. Anderson y Domsch (1990, 1993) describen que a las comunidades de microorganismos del suelo se las puede analizar a través de coeficientes eco-fisiológicos que reflejan la tasa de respiración específica o la eficiencia metabólica por unidad de biomasa microbiana del suelo ( $qCO_2$ ) y por otra parte determinan la contribución de la biomasa microbiana al carbono orgánico del suelo ( $qM$ ) (Anderson, 2003). Condiciones estresantes para los microorganismos impactan diferencialmente sobre su crecimiento (C-BM) o sobre su actividad (respiración biológica), por lo que la aclimatación para sobrevivir y permanecer activos frente al estrés son reflejados en estos coeficientes eco-fisiológicos (Schimel *et al.*, 2007). Se plantean que los valores bajos de  $qCO_2$  demuestran una mayor eficiencia de los microorganismos en la utilización del carbono lo que puede conducir a un mayor secuestro de carbono por vía microbiana y disminución del potencial de emisiones de  $CO_2$  a la atmósfera, reconocido cada vez más como un mecanismo impulsor para la acumulación de C a largo plazo (Treseder, 2008; Bradford *et al.*, 2013; Kheirfam, 2020).

La “salud” de un agro-ecosistema puede definirse desde la capacidad que tiene el suelo para sustentar la producción, y a su vez conservar la sustentabilidad del medio

ambiente incluido el ser humano (Doran y Parkin, 1994; Haynes, 2000). Los efectos de las prácticas agrícolas pueden ser evaluados a partir del análisis de algunas propiedades biológicas del suelo, ya que estas tienen la particularidad de ser sensibles y de responder rápidamente frente a situaciones de degradación o de mejoría del ecosistema (Dick, 1994; Bandick y Dick, 1999; Marcos y Olivera, 2016; Schlöter *et al.*, 2018). Entre las variables microbiológicas utilizadas para estos fines, se destacan el carbono de la biomasa microbiana, su actividad metabólica y el recuento de aquellas poblaciones más importantes de la microbiota del suelo (hongos y bacterias), la diversidad de procariotas y/o eucariotas, las micorrizas arbusculares, los grupos funcionales relacionados con ciclos de C, N y P, y los coeficientes ecofisiológicos (Nielsen *et al.*, 2002; Vasconcellos *et al.*, 2016; Krüger *et al.*, 2018). Actualmente, se considera que los parámetros microbiológicos podrían ser usados como indicadores para interpretar el estado de degradación de los suelos, lo cual fue utilizado en otros trabajos que lo incorporaron como bio-indicadores o bio-monitores de los cambios que ocurren en el suelo (Nielsen *et al.*, 2002, Garbisu *et al.*, 2011; Marcos y Olivera, 2016).

### **1.3. Factores que afectan a los microorganismos del suelo en los ecosistemas**

#### **1.3.1. Gradiente ambiental asociados al clima y la vegetación**

Los ecosistemas de pastizales cubren alrededor del 30% de la superficie terrestre del mundo (Sala y Paruelo, 1997; Costanza *et al.*, 1997; Lei *et al.*, 2016; Zhao *et al.*, 2020) y almacenan del 28-37% del carbono en los ecosistemas terrestres con un rol clave en el ciclo del carbono (Lal, 2004; IPCC, 2007). Patagonia Sur presenta diferentes áreas ecológicas, pero la mayor parte es caracterizada como una región árida-semiárida (Peri *et al.*, 2013). Los patrones de vegetación varían según el gradiente de precipitación (Jobbágy *et al.*, 1995), el tipo de suelo y la variación topográfica (Soriano y Sala, 1983; Bisigato y Bertiller, 2004). En este contexto, se ha informado que las comunidades de microorganismos del suelo responden a las condiciones climáticas, que están definidas por las precipitaciones y temperaturas de cada ambiente (Insam *et al.*, 1989; Raich y Schlesinger, 1992; Austin *et al.*, 2004; Cookson *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2016; Zhou *et al.*, 2016). Asimismo, ha sido demostrado que las tasas de respiración del suelo *in-situ* se correlacionan con las temperaturas del aire y del suelo, y con la precipitación media mensual y el contenido volumétrico de agua del suelo (Peri *et al.*, 2015). También, de manera indirecta se determinó que la respuesta de la microbiota edáfica al clima están relacionadas estrechamente con la productividad de

las plantas (Austin *et al.*, 2004; Bais *et al.*, 2006; Fierer y Jackson, 2006; Dennis *et al.*, 2010; Lange *et al.*, 2015; Ren *et al.*, 2017). En los ecosistemas naturales, los restos vegetales de las especies son la fuente principal de energía para el crecimiento de los microorganismos del suelo en muchos hábitats y consecuentemente regulan el ciclado de nutrientes (Franzluebbers *et al.*, 1995; Roper y Gupta, 1995; Goberna *et al.*, 2007; Araújo *et al.*, 2008; Ponge, 2015). La presencia de las especies vegetales, como lo expresan Belsky *et al.* (1993), crea un microclima (humedad y temperatura) y aporta materia orgánica al suelo que favorece la actividad biológica de la micro y macro fauna. En este sentido, las comunidades de plantas y tipo de vegetación influirían en la microbiología del suelo al tener efectos positivos sobre los microorganismos, especialmente por los exudados radicales que representan entre el 10 y 30 % de los fotosintatos de la planta (Ross *et al.*, 1984; Bristow y Jarvis, 1991; Adu-Gyamfi *et al.*, 2000; Grayston *et al.*, 2001), o negativos por competir por los recursos disponibles (Van Veen *et al.*, 1989; Bardgett y Leemans, 1996; Lipson *et al.*, 2000; Piao *et al.*, 2000; Bardgett *et al.*, 2002).

Las condiciones ambientales de precipitaciones y/o temperaturas también inciden sobre los microorganismos asociados a las plantas de los pastizales como los hongos micorrizicos arbusculares (Miller *et al.*, 2012). Algunos trabajos han informado que las condiciones de humedad del suelo afectan directamente a los hongos MA al afectar el desarrollo de las raíces de las plantas (Deepika y Kothamasi, 2015; Li *et al.*, 2015; Martínez-García *et al.*, 2015). La baja humedad del suelo también limita la disponibilidad de nutrientes del suelo, y consecuentemente el crecimiento de las plantas, el desarrollo de las raíces y la colonización de los hongos MA (Nouri *et al.*, 2014). Además, las propiedades físico-químicas son consideradas como moderadores potenciales de la variación de las comunidades de hongos MA, al afectar en forma positiva o negativa a la simbiosis micorrizica en los ecosistemas (Tuomi *et al.*, 2001; Mohammad *et al.*, 2003; Hoeksema *et al.*, 2010). A su vez la colonización de hongos MA tienen cierta especificidad que varía entre las formas de vidas de las especies vegetales (Hoeksema *et al.*, 2010; Davison *et al.*, 2020). Ciertamente, un estudio en las comunidades de plantas de la estepa del Noroeste Patagónico, Fontenla *et al.* (2001) documentaron la presencia de MA en 97 especies nativas, dentro de las cuales se citaron gramíneas del estrato intercoironal de valor forrajero (e.g. *Poa lanuginosa*, *P. ligularis*), y especies de arbustos y subarbustos (e.g. *Berberis aff. buxifolia*, *Adesmia boronioides*, *Acaena* sp.). Por lo tanto, las diferentes áreas

ecológicas en Santa Cruz (Peri *et al.*, 2013) entre ellas, la estepa magallánica húmeda compuesta principalmente por especies graminosas (*Festuca spp.*, *Poa spp.*, *Rytidosperma virescens*), la estepa magallánica seca con una comunidad vegetal dominado por coironales de (*Festuca spp.* y *Pappostipa spp.*), intercoironal (*Poa spp.*, *Carex spp.* y *R. virescens*), subarbustos (*Nardophyllum bryoides*, *Nassauvia aculeata*) y herbáceas como (*Luzula chilensis*, *Perezia recurvata*) y arbustos aislados de *Berberis spp.*, y el área ecológica del matorral de mata negra con predominio del arbusto *Mulguraea tridens*, podrían tener implicancias sobre las comunidades de microorganismos del suelo en estos ecosistemas Australes de la Patagonia. Estas diferencias entre los tipos de vegetación pueden estar relacionadas con variaciones en la calidad de la hojarasca y diferencias en las proporciones de la biomasa de grupos funcionales dentro de la comunidad microbiana del suelo (Paul y Clark, 1996; Yeates y Sagar, 1998; Bais *et al.*, 2006; Lauber *et al.*, 2009; Rousk *et al.*, 2010; Siles y Margesin, 2016; Egan *et al.*, 2018).

Por otro lado, en la vecindad de las plantas se generan “parches” de fertilidad que mejoran la actividad biológica del suelo (Garner y Steinberger, 1989). El área de influencia en cercanías de las matas de plantas y debajo del canopy de arbustos presentan en general mejores condiciones para la actividad biológica del suelo, por aportar mayor cantidad de nutrientes a través de la hojarasca y por mantener mejores condiciones de humedad, permitiendo mejoras en las condiciones bióticas y abióticas del entorno (Garner y Steinberger, 1989; Groffman *et al.*, 1996; Schlesinger *et al.*, 1996; Abril *et al.*, 2009; Gonzalez-Polo y Austin, 2009). Por ejemplo, en la provincia de Santa Cruz, aproximadamente 2.830.000 ha conforman el área ecológica denominada “Matorral de Mata Negra”, una estepa arbustiva dominada en un 60-70% por el arbusto “mata negra” (*M. tridens*) (Billoni *et al.*, 2016). Estos arbustos conforman parches que determinan una distribución heterogénea de la vegetación, desempeñando un rol fundamental en la dinámica de nutrientes y de la materia orgánica de residuos en descomposición, proceso fundamental en el funcionamiento de los ecosistemas (Gonzalez-Polo y Austin, 2009).

### **1.3.2. Efectos del pastoreo sobre los microorganismos del suelo**

Existen antecedentes donde evaluaron al pastoreo como uno de los principales factores que afectan las propiedades físicas o químicas del suelo, y en particular el stock de C del suelo en ecosistemas de pastizales interactuando con el clima y tipo

de vegetación (Willat y Pullar, 1983; Braunack y Walker, 1985; Cui *et al.*, 2005; Steffens *et al.*, 2008; Peri *et al.*, 2016, 2018). La comprensión de los efectos del pastoreo sobre los parámetros físicos, químicos y biológicos del suelo se han estudiados en varios trabajos encontrándose que los efectos de la intensidad del pastoreo a través de las cargas ganaderas muestran respuestas variables, con trabajos que no observaron cambios significativos (Hamilton y Frank, 2001; Raiesi y Asadi, 2006; Teague *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2012; Lin *et al.*, 2017), otros donde se determinó efectos negativos (Holt, 1997; Pei *et al.*, 2008; Golluscio *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2015; Zhou *et al.*, 2017), y otros mostraron que la intensidades de pastoreo generaron incrementos en algunos de los parámetros microbiológicos del suelo (Holland *et al.*, 1996; Hamilton y Frank, 2001; Wienhold *et al.*, 2001; Reeder y Schuman, 2002). Asimismo, ha sido demostrado que el pastoreo también inciden de manera diferencial sobre la abundancia y composición de las comunidades de hongos y bacterias del suelo (Bardgett y McAlister, 1999; Bardgett *et al.*, 2001; Patra *et al.*, 2005; Ford *et al.*, 2013; Weber *et al.*, 2013; Egan *et al.*, 2018). Estas respuestas diferenciales del efecto del pastoreo sobre los microorganismos del suelo podría deberse al impacto indirecto que los animales ejercen sobre las plantas y propiedades del suelo, además cada ecosistema parece tener una capacidad de resiliencia sobre los disturbios de presión de la herbivoría (Hamilton y Frank, 2001; Lauber *et al.*, 2008; Steffens *et al.*, 2008; Golluscio *et al.*, 2009).

El ganado en pastoreo aporta sus deyecciones (heces y orina) al ecosistema favoreciendo el crecimiento y las actividades de las comunidades edáficas del suelo y consecuentemente sobre las especies vegetales al estimular cambios en la cantidad y calidad de los exudados de las raíces (Bardgett *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2006). También existen antecedentes relacionados a que el pisoteo de los animales en pastoreo facilita la incorporación de hojarasca superficial al suelo, aumentando los compuestos carbonados y nitrógeno que favorecería el crecimiento de los microorganismos (Holland *et al.*, 1996; Bardgett *et al.*, 1998; Hamilton y Frank, 2001). Sin embargo, se han reportado efectos negativos del pastoreo sobre los microorganismos del suelo a través de la pérdida de cobertura de vegetación y aumento de suelo desnudo que reducen la actividad biológica del suelo (Ash y Mchyor, 1998; Peri *et al.*, 2015; Moinet *et al.*, 2016). En este mismo sentido, Holt (1997) determinó que la biomasa microbiana del suelo se redujo producto del pastoreo en los ecosistemas áridos de Australia, influenciado por la menor humedad en el suelo

(producto de mayor evaporación a causa de la baja cobertura vegetal del suelo) y una menor tasa de entrada de materia orgánica. Por lo tanto, el efecto negativo de altas intensidades de pastoreo sobre la actividad, diversidad y la biomasa de las comunidades de microorganismos del suelo, estaría determinado en forma indirecta por la reducción en el crecimiento y cobertura de las plantas, y disminución de aportes de restos vegetales de la parte aérea y radical (Roper y Gupta, 1995; Tongway y Ludwig, 1997; Northup *et al.*, 1999; Stark y Grellmann, 2002).

En relación a las micorrizas, se ha determinado que la defoliación por el pastoreo intenso afecta el crecimiento de hierbas y arbustos, y por consiguiente a la colonización MA; ya que la reducción de la superficie foliar de las plantas disminuye el suministro de carbono a las raíces y a los hongos micorrícicos arbusculares (Harley y Smith, 1983; Bethlenfalvay y Dakessian, 1984; Bethlenfalvay *et al.*, 1985; Gehring y Whitham, 2002). Sin embargo, cuando la defoliación las cargas animales son moderadas, la asignación de carbono a las raíces aumentó estimulando la colonización micorrícica (Waters y Borowicz, 1994; Mikola *et al.*, 2001; Hokka *et al.*, 2004; Kula *et al.*, 2005).

Además, las respuestas de la colonización MA depende de las especies vegetales (anuales, perennes, herbáceas, leñosas), ya que estas tienen diferentes estrategias de crecimiento por lo que responden de manera diferente a la pérdida de tejido (Hawkes y Sullivan, 2001). Mientras que las especies anuales tienden a utilizar las reservas destinadas a la reproducción, las gramíneas perennes invierten en el crecimiento de brotes para compensar, y las leñosas que tienen grandes reservas de carbono para reemplazar el tejido perdido (Kosola *et al.*, 2004). La reasignación de recursos que experimentan las plantas, y que involucran a las reservas de los sistemas de raíces, inciden en las diferentes respuestas de los hongos micorrizicos en las plantas (Gehring y Whitham, 1994). Por ejemplo, Gehring y Whitham (2002) determinaron para 35 especies de plantas que la herbívora redujo la colonización de los hongos formadores de micorrizas en el 65% de las especies evaluadas, un 5% presentó un incremento en la colonización y el 30% restante no se vieron afectadas. En otro estudio la colonización por hongos MA no mostró diferencias en la colonización a diferentes intensidades de pastoreo (Medina-Roldan *et al.*, 2008).

En este contexto, el otro factor del pastoreo que regula la colonización de los hongos micorrícicos a la raíz está relacionada al tipo de manejo del pastoreo a través de las frecuencias de defoliación. Por ejemplo, en los manejos rotativos se permite que la

planta se recupere con una cierta frecuencia de tiempo hasta que se le vuelva a realizar una remoción de tejido fotosintético, incidiendo en las plantas y en los hongos MA (Briske y Richards, 1995; Dawson *et al.*, 2000; Walling y Zabinski, 2006; Savory y Butterfield, 2016). Mientras varios estudios determinaron que la colonización de MA no fue afectada bajo distintas frecuencias de defoliación (Walling y Zabinski, 2006; Torres *et al.*, 2011; Ambrosino *et al.*, 2018, 2020), otros autores determinaron un aumento o disminución a mayores frecuencias de remoción de biomasa vegetal en diferentes especies de plantas (Gehring y Whitham 1994, 2002; Allsopp, 1998; Klironomos *et al.*, 2004; Barto y Rillig, 2010; Fan *et al.*, 2019). Además, el efecto del pastoreo sobre la colonización MA estaría relacionada con la interacción con los factores bióticos y abióticos de cada ambiente en particular (Mendoza *et al.*, 2002; Ruotsalainen y Eskelinen, 2011).

### **1.3.3. Efecto del estado hídrico del suelo sobre los microorganismos**

Las predicciones de cambio climático indican que los años extremadamente secos tendrán a ser más frecuentes en el futuro, modificándose también los patrones de precipitaciones (Houghton *et al.*, 2001), y para la región de Patagonia Sur se predice un aumento de las temperaturas y/o precipitaciones (Kreps *et al.*, 2012). En este contexto, se considera importante determinar de qué manera puede incidir las variaciones en el contenido de humedad del suelo sobre los microorganismos del suelo y su funcionalidad, especialmente en estos ecosistemas áridos patagónicos.

El contenido de humedad del suelo es un factor que afecta a los microorganismos en forma directa e indirecta a través de su efecto sobre el crecimiento de las plantas (Edgerton *et al.*, 1995). Sugiriendo de esta manera que la disponibilidad de agua es un factor abiótico importante que regula el crecimiento de las comunidades microbianas (Liu *et al.*, 2009; Sorensen *et al.*, 2013). Los mayores contenidos de humedad del suelo incrementan la descomposición de la materia orgánica del suelo, y de esta manera, estimulan a los microorganismos del suelo a través de aumentos en su biomasa, actividad y diversidad (Kandeler y Bohm, 1996; Fierer y Schimel, 2003; Saetre y Stark, 2005; Vásquez y Dávila, 2008). Ren *et al.* (2017) determinaron que aumentos de las precipitaciones mejoraron el carbono de la biomasa microbiana en suelos de pastizales y arbustales, debido a una mejor difusión de sustratos disponibles, y también se asocia a una mayor rotación de la necromasa microbiana que son utilizados para el crecimiento de los microorganismos vivos (Liang *et al.*,

2019). Estudios sobre eventos y tratamientos de sequía, han determinado efectos negativos sobre los microorganismos del suelo al reducirse la biomasa microbiana y su actividad, dependiendo su magnitud con la capacidad de retención de agua producto del contenido de materia orgánica y textura del suelo (Jensen *et al.*, 2003; Alster *et al.*, 2013). La menor actividad microbiana esta asociada con el estrés hídrico que se presenta en el suelo, llevando a que gran parte de los microorganismos del suelo mueran o permanecen inactivos (Brock *et al.*, 1984; Jensen *et al.*, 2003; Schimel *et al.*, 2007). Además, existen respuestas diferenciales en las comunidades de microorganismos, que están determinadas por la composición de los microorganismos del suelo, donde las bacterias generalmente son más dependientes de la película de agua sobre las partículas de suelo para su movilidad y actividad en comparación a los hongos (Rosacker y Kieft, 1990; Killham, 1994). En los ambientes áridos, caracterizados por estar sujeto a periodos de sequía prolongados las comunidades de microorganismos están representadas probablemente por un mayor predominio de hongos (Joergensen *et al.*, 1995; Zeng *et al.*, 2014; Xu *et al.*, 2015), los cuales pueden descomponer la materia orgánica más recalcitrante con mayor eficiencia respecto a las bacterias (Anderson y Domsch, 1990; Paul y Clark, 1996; Craine *et al.*, 2007). Los hongos también descomponen materiales con alta relación C/N sin hacer frente a las limitaciones de nutrientes y permanecen activos bajo potenciales de agua bajos (Killham, 1994). Es decir, los estudios indican que la sequía mejora la biomasa microbiana representada por la comunidad de hongos. Las respuestas diferenciales de la biomasa microbiana a las condiciones de sequía estarían representando la existencia de comunidades microbianas generalistas tolerantes a la sequía (Yuste *et al.*, 2011; Fuchslueger *et al.*, 2014). Sin embargo, en muchos casos la respuesta del contenido de humedad interactúa con otros factores ambientales, condicionando las respuestas de las poblaciones microbianas y determinando diferentes grados de resistencia o resiliencia frente al estrés hídrico (Shing *et al.*, 1989; Chapin *et al.*, 2002; Allison y Martiny, 2008; Geng *et al.*, 2015).

#### **1.3.4. Efecto de los nutrientes del suelo sobre los microorganismos**

En estos ecosistemas de Patagonia Sur, se ha demostrado que existe un marcado gradiente del contenido de nutrientes en los suelos (ej., el stock total de N varía de 0,13 a 2,21 Kg N m<sup>-2</sup>) que depende de las precipitaciones y temperaturas particulares de cada ambiente (Peri *et al.*, 2019). Ciertamente, se plantea que el N es un nutriente



limitante para el crecimiento de las plantas en suelos semiáridos (Mott *et al.*, 1985; Brueck *et al.*, 2010; Zhu *et al.*, 2015; Duran *et al.*, 2016; Peri *et al.*, 2019). Los microorganismos del suelo están involucrados en el ciclo de los nutrientes, la mineralización de restos orgánicos, la formación de agregados y humus (Franzluebbers *et al.*, 1995; Goberna *et al.*, 2007; Araújo *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2011), y además contribuyen a caracterizar la calidad y fertilidad del suelo (Powlson, 1994; Haynes, 2000). El aporte de nutrientes al suelo mediante la aplicación de fertilizante favorece la disponibilidad en el suelo, y en consecuencia repercute de manera positiva en las comunidades de microorganismos y su actividad (Alexander, 1980; Peacock *et al.*, 2001; Marschner *et al.*, 2003; Zhong *et al.*, 2010; Cinnadurai *et al.*, 2013; Dietrich *et al.*, 2017; Guo *et al.*, 2019). Según Zhong *et al.* (2010) la fertilización responde a la demanda nutricionales de las plantas, y esto genera un incremento de la actividad y crecimiento de las raíces de las plantas, lo que promueve un aumento de la biomasa microbiana. La mayor biomasa microbiana se relaciona positivamente con el aporte de fertilizantes minerales al promover mayor crecimiento de raíces y acumulación de residuos vegetales en el suelo como fuente de energía y alimento para los microorganismos (Brookes *et al.*, 1990; Omay *et al.*, 1997). Aunque también se sabe que la disponibilidad de N en el suelo resulta en una fuerte competencia entre las plantas y los microorganismos (Vitousek y Howart, 1991; Piao *et al.*, 2000; Bardgett *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2010; Zhong *et al.*, 2010). Es por ello, que algunos trabajos no mostraron un efecto positivo en la comunidad microbiana cuando los suelos fueron fertilizados (Strecker *et al.*, 2015; Zhu *et al.*, 2016; Guo *et al.*, 2019). Por lo tanto, la existencia de competencias entre las plantas y los microorganismos del suelo cuando existe limitación de algún nutriente podría tener implicancias en las respuestas de los parámetros microbiológicos del suelo (Smolander *et al.*, 1994; Merrick y Edwards, 1995). En este sentido, las relaciones estequiométricas de los demás nutrientes del suelo juegan un rol importante sobre las respuestas positivas del carbono de la biomasa microbiana del suelo cuando estos son fertilizados, dado que ésta depende también de la cantidad de N y P del suelo (Cleveland *et al.*, 2002; Cleveland y Townsend, 2006). Hu *et al.* (2011) determinaron que los fertilizantes inorgánicos afectan los parámetros biológicos debido al incremento del contenido del carbono orgánico del suelo, incidiendo positivamente en el crecimiento de los microorganismos. Según Fontaine *et al.*, (2004) la tasa de crecimiento de los microorganismos es controlada por la disponibilidad de nutrientes en la materia

orgánica y en la solución del suelo. Sin embargo, ha sido demostrado que los suelos fertilizados aumentan la eficiencia en la utilización del carbono por parte de los microorganismos, ocurriendo lo contrario en suelos deficientes en nutrientes, debido a la poca disponibilidad de P y en segundo lugar a N (Hu *et al.*, 2011). Michelsen *et al.* (1999) en suelos deficientes en nutrientes del norte de Suecia, aplicando la adición de fertilizantes NPK observaron un aumento del 30% de la biomasa microbiana a lo largo de varios años de ensayo, siendo el incremento del carbono de la biomasa microbiana producto del aporte de nutrientes. En contraste, Stark y Grellmann (2002) evaluando la respuesta de la fertilización al Norte de Noruega encontraron que el carbono de la biomasa fue significativamente reducido al igual que la respiración en estos suelos de la tundra ártica.

Los antecedentes expuestos evidencian la poca información sobre la microbiología de suelos (biomasa y actividad microbiana y micorrizas) en los diferentes ecosistemas de Patagonia Sur, lo cual es relevante para entender el funcionamiento de estos ecosistemas patagónicos ante distintas variables ambientales y bajo manejo animal, y evaluar su influencia en la productividad de los mismos. Por lo tanto, el presente estudio pretende generar conocimiento sobre la implicancia de los microorganismos asociados al suelo y plantas en diferentes ecosistemas bajo uso ganadero y diferentes condiciones ambientales en Patagonia Sur.

#### **1. 4. OBJETIVOS E HIPÓTESIS DE TRABAJO DE LA TESIS**

El objetivo general de la presente tesis fue estudiar la influencia de los diferentes usos históricos ganaderos y condiciones ambientales en ecosistemas áridos y semiáridos de Patagonia Sur sobre los microorganismos asociados al suelo y a las plantas. Para llevar adelante estos aspectos, se realizaron estudios en condiciones naturales de campo y ensayos experimentales que permitieron evaluar los parámetros biológicos del suelo, sobre aspectos particulares al agregado de nutrientes, condiciones de sequía y frecuencia de defoliación. Este tipo de información nos permite entender y analizar las implicancias de la biología del suelo representada por los microorganismos en el funcionamiento de estos ecosistemas. Para llevar adelante este estudio, del objetivo general se desprendieron 4 objetivos específicos, cada uno de los cuales será desarrollado junto con sus respectivas hipótesis en capítulos individuales de la presente tesis. Los objetivos específicos fueron los siguientes:

**Objetivo específico N°1:** Estudiar la respuesta de las variables microbiológicas como el carbono de la biomasa microbiana, la respiración biológica del suelo, abundancia de hongos y bacterias totales y los coeficientes eco-fisiológicos microbianos al gradiente ambiental (climático y vegetacional) y a las cargas ganaderas ovinas contrastantes de largo plazo. En el caso particular del área ecológica Matorral de Mata Negra se evaluará la microbiología del suelo debajo del canopeo del arbustos *Mulguraea tridens* comparado con los micorsitios del interparche.

**Hipótesis:**

“El carbono de la biomasa microbiana, la abundancia de hongos y bacterias totales y la respiración del suelo se correlacionan positivamente con las precipitaciones y negativamente con cargas ganaderas altas, donde la magnitud de la respuesta dependerá del área ecológica estudiada. También, se espera una respuesta de los parámetros microbiológicos que será mayor en los micrositos del canopeo respecto a los micrositos del interparche”.

**Objetivo específico N°2:** Determinar la simbiosis de micorrizas arbusculares (MA) en diferentes áreas ecológicas de la Patagonia Austral y analizar el efecto del pastoreo. Para ello, se estudió la colonización de hongos MA en plantas *Poa duseii*, *Rytidosperma virescens*, *Festuca gracillima*, *Nardophillum bryoides*, *Mulguraea tridens* y *Carex argentina* que son dominantes en estos ecosistemas y que están sujetas a manejos de pastoreo con cargas ganaderas contrastantes.

**Las hipótesis:**

- I) La colonización de los hongos MA en las áreas ecológicas de la Patagonia Austral tendrán una correlación positiva con las mejores condiciones bióticas y abióticas de los sitios.
- II) La simbiosis de hongos MA en las plantas presentará una relación negativa con cargas ganaderas altas de largo plazo.
- III) Las respuestas de la colonización de MA respecto de la carga ganadera y los ambientes dependerá de las formas de vida de la especie vegetal estudiadas, determinándose que la colonización MA de los subarbustos y arbustos no se afectarán por la carga ganadera, y por el contrario las especies de gramíneas disminuirán la colonización MA en sus raíces con las altas cargas ganaderas y a su vez esto dependerá del área ecológica.

**Objetivo específico N°3:** Estudiar experimentalmente la influencia del aporte de nutrientes (fertilización) y escenarios de variaciones de la precipitación (riego y sequía) en ambientes de la estepa magallánica seca sobre el carbono de la biomasa microbiana (C-BM), respiración biológica del suelo (RBS) y los coeficientes metabólicos microbianos.

**La hipótesis:**

“La fertilización y el riego aplicados al suelo tendrán un efecto positivo sobre la biomasa microbiana y la respiración biológica del suelo. Por el contrario, las condiciones de sequía se relacionarán de manera inversa con la biomasa microbiana y la respiración del suelo”.

**Objetivo específico N°4:** Evaluar el efecto de distintas frecuencias de defoliación sobre plantas de *Rytidosperma virescens* y colonización de MA en las raíces de plantas creciendo en condiciones naturales de campo y bajo condiciones contraladas en invernadero.

**La hipótesis:**

“La colonización de los hongos MA disminuirá a medida que aumentamos las frecuencias de cortes por la remoción de biomasa aérea, independientemente de las condiciones de crecimiento de las plantas”.

### **1.5. Organización de la tesis**

La presente tesis se desarrolla en 6 capítulos, de los cuales el primero corresponde a la introducción y el último a la discusión general. Los capítulos intermedios se desarrollan en relación a los objetivos específicos (OE) de la tesis exponiendo los resultados y explicitando la metodología utilizada. El Capítulo 1 presenta primero el problema, los antecedentes sobre los microorganismos asociados al suelo y a las plantas, y finalmente los objetivos y las hipótesis subyacentes de la tesis. En el Capítulo 2 se presentan los efectos del gradiente ambiental representado por tres áreas ecológicas y las cargas ganaderas contrastantes en ecosistemas de la Patagonia Austral sobre los parámetros microbiológicos del suelo (OE N° 1). El Capítulo 3 trata de la colonización de MA en raíces de especies representativas de las áreas ecológicas de la Patagonia Austral y los efectos del pastoreo sobre las plantas en cada uno de los ambientes (OE N° 2). El Capítulo 4 analiza los efectos de la

fertilización mineral (N y NPK y micronutrientes) y las variaciones de la precipitación (sequía y riego) en las respuestas del carbono de la biomasa microbiana y la respiración del suelo y la relación con los parámetros de las plantas (OE N° 4). En el Capítulo 5 se determina cómo distintas frecuencias de defoliación afecta el crecimiento de las plantas de *R. virescens* y a los hongos micorrizicos asociados a sus raíces (OE N°5). Por ultimo en el Capítulo 6 se realiza una discusión general y análisis de los resultados obtenidos en todos los capítulos de la tesis para validar cada una de las hipótesis, también se presentan aplicaciones prácticas de los resultados, futuras líneas de investigación y conclusiones alcanzadas por la tesis.

## **Capítulo 2**

# **LAS COMUNIDADES MICROBIANAS DEL SUELO RESPONDEN AL GRADIENTE AMBIENTAL Y PASTOREO OVINO EN PATAGONIA SUR ARGENTINA**

## 2. 1. INTRODUCCIÓN

En Patagonia Sur los pastizales naturales representan el 85% de la superficie (Peri *et al.*, 2013). La región presenta diferentes áreas ecológicas, pero la mayor parte es caracterizada como una región árida-semiárida, donde las precipitaciones disminuyen de 1000 a 200 mm año en un gradiente oeste-este (Jobbágy y Sala, 2002; Peri *et al.*, 2013). La ganadería ovina extensiva es la principal actividad de Santa Cruz, con 2.770.000 cabezas (SENASA, 2017). Las cargas animales varían desde 0,13 a 0,75 cabezas ha<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup> según las áreas ecológicas y la intensidad de uso (Peri *et al.*, 2013), predominando el pastoreo continuo o de veranada-invernada. Los ecosistemas de estepa cubren la mayor parte de la superficie en Santa Cruz, y se caracterizan principalmente por la presencia de coirones (*Festuca*, *Stipa*), pastos cortos (*Poa*, *Carex*) y arbustos (*Berberis*, *Mulguraea*) (Borrelli y Oliva, 2001; Peri *et al.*, 2013). Los ecosistemas de pastizales almacenan del 28-37% del carbono y tienen un rol clave en el ciclo (Lal, 2004; IPCC, 2007). El pastoreo es uno de los principales factores que afectan el stock de C del suelo en ecosistemas de pastizales, interactuando con el clima y tipo de vegetación, que influye en la entrada de materia orgánica y propiedades asociadas del suelo (Cui *et al.*, 2005; Steffens *et al.*, 2008; Peri *et al.*, 2016, 2018). Los microorganismos del suelo tienen influencia en diversos procesos y funciones de los ecosistemas naturales (Franzluebbers *et al.*, 1995; Goberna *et al.*, 2007; Ponge, 2015), como el reciclaje de nutriente que hacen a la fertilidad del suelo (Franzluebbers *et al.*, 1995), la descomposición y mineralización de los compuestos orgánicos y es una fuente lábil de nutrientes disponible para las plantas (Araújo *et al.*, 2008, 2009). Es por ello, que el componente biológico del suelo puede ser utilizado como una señal de “alerta” temprana ante un posible deterioro de los ecosistemas (García Izquierdo *et al.*, 2003 y Romaniuk *et al.*, 2016), siendo el carbono de la biomasa microbiana (C-BM) y la actividad microbiana potenciales indicadores utilizados para el monitoreo (Nannipieri *et al.*, 2003). Los nutrientes que puede contener un suelo se asocia con el C-BM, ya que esta representa entre un 1-4 % de la parte activa del carbono orgánico del suelo (Sparling, 1992; Truu *et al.*, 2008). A su vez, la estructura y actividad de las comunidades microbianas en los suelos están influenciadas por las propiedades físicas y químicas del suelo, y la cantidad y calidad de los recursos que ingresan a éste, ya sea como detritus de las plantas o como rizodeposición dada por los exudados radicales (Kent y Triplett, 2002; Lauber *et al.*, 2008; Delgado-Baquerizo *et al.*, 2016).

Los exudados radicales proporcionan el sustrato primario de "alimento" a los microorganismos del suelo (Bais *et al.*, 2006; Dennis *et al.*, 2010).

Los patrones de vegetación en Patagonia varían según el gradiente de precipitación (Jobbágy *et al.*, 1995), el tipo de suelo y la variación topográfica (Soriano y Sala, 1983; Bisigato y Bertiller, 2004). Las plantas pueden tener efectos positivos sobre los microorganismos a través del aporte de sus exudados radicales y los restos orgánicos vegetales, que son utilizados por los microorganismos como sustrato para la biosíntesis, alimentación y fuente de energía, o negativos por competir por los recursos disponibles en el ambiente (Van Veen *et al.*, 1989).

El parámetro microbiológico de respiración microbiana del suelo evaluada a través de la producción de CO<sub>2</sub> liberado refleja directamente la actividad microbiana e indirectamente la disponibilidad de sustrato (Noellemeyer *et al.*, 2008). Se considera a la respiración basal como un indicador de la calidad biológica del suelo (Zeng *et al.*, 2014), el cual caracteriza la actividad microbiana de un determinado suelo en condiciones de equilibrio (Ashman *et al.*, 2009; Geyer *et al.*, 2016).

Muchas veces, la composición de la comunidad microbiana es diferente en cuanto a la eficiencia del uso de los recursos (Lipson *et al.*, 2009; Keiblinger *et al.*, 2010). De ahí, que el coeficiente metabólico (qCO<sub>2</sub>) es otro bioindicador de los disturbios, que nos da información de la actividad de los microorganismos en relación al carbono de su biomasa microbiana, donde valores altos reflejan menor eficiencia microbiana (Anderson y Domsch, 1990). Los cambios de C-BM y qCO<sub>2</sub> se han utilizado para reflejar cambios en la entrada de materia orgánica a los suelos, la eficiencia microbiana en la conversión de C disponible para su biomasa, las pérdidas de C del suelo y la estabilización de C orgánico por fracciones minerales del suelo (Liao y Boutton, 2008; Treseder, 2008; Kheirfam, 2020).

Los ecosistemas áridos y semi-áridos presentan una distribución irregular de la vegetación, que llevan a la formación de microhábitats, donde la vegetación se distribuye en forma de mosaicos o parches, lo que conduce altos niveles de heterogeneidad a escala horizontal y vertical (Collins *et al.*, 2008; Abril *et al.*, 2009; Gonzalez-Polo y Austin, 2009). En la provincia de Santa Cruz, aproximadamente 2.830.000 ha conforman el área ecológica denominada "Matorral de Mata Negra", una estepa arbustiva dominada en un 60-70% por el arbusto *Mulguraea tridens* "mata negra" (Billoni *et al.*, 2016). Los arbustos generalmente distribuidos en parches, constituyen microhábitats estratégicos en ecosistemas áridos ya que facilitarían



muchos procesos y recursos (ej., dinámica de los nutrientes) en estos ambientes (Austin *et al.*, 2004; Goberna *et al.*, 2007; Rodríguez-Echeverría *et al.*, 2013; Peri *et al.*, 2013). De esta manera, el dosel de los arbustos brinda mejores condiciones para la biología del suelo (Garner y Steinberger, 1989; Schlesinger *et al.*, 1996), induciendo cambios en la densidad, distribución, actividad y composición de la comunidad de microorganismos edáficos (McCaig *et al.*, 1999; Johnson *et al.*, 2003; Shamir y Steinberger, 2007; Goberna *et al.*, 2007; Hortal *et al.*, 2013, 2015).

En general, los estudios publicados sobre los efectos de la intensidad del pastoreo sobre el carbono orgánico del suelo (COS) y C-BM han mostrado resultados variables: sin cambios significativos (Nosetto *et al.*, 2006; Raiesi y Asadi, 2006; Steffens *et al.*, 2008; Teague *et al.*, 2011), disminución (Pei *et al.*, 2008; Golluscio *et al.*, 2009; Zhou *et al.*, 2017) y aumentos con las intensidades de pastoreo (Holland *et al.*, 1996; Hamilton y Frank, 2001; Wienhold *et al.*, 2001; Reeder y Schuman, 2002). También la abundancia y composición de las comunidades de hongos y bacterias del suelo se ven influenciadas por la intensidad de pastoreo de manera diferente en cada ecosistema (Bardgett *et al.*, 2001; Patra *et al.*, 2005), determinada en parte por el contenido de los nutrientes del suelo (Lauber *et al.*, 2008).

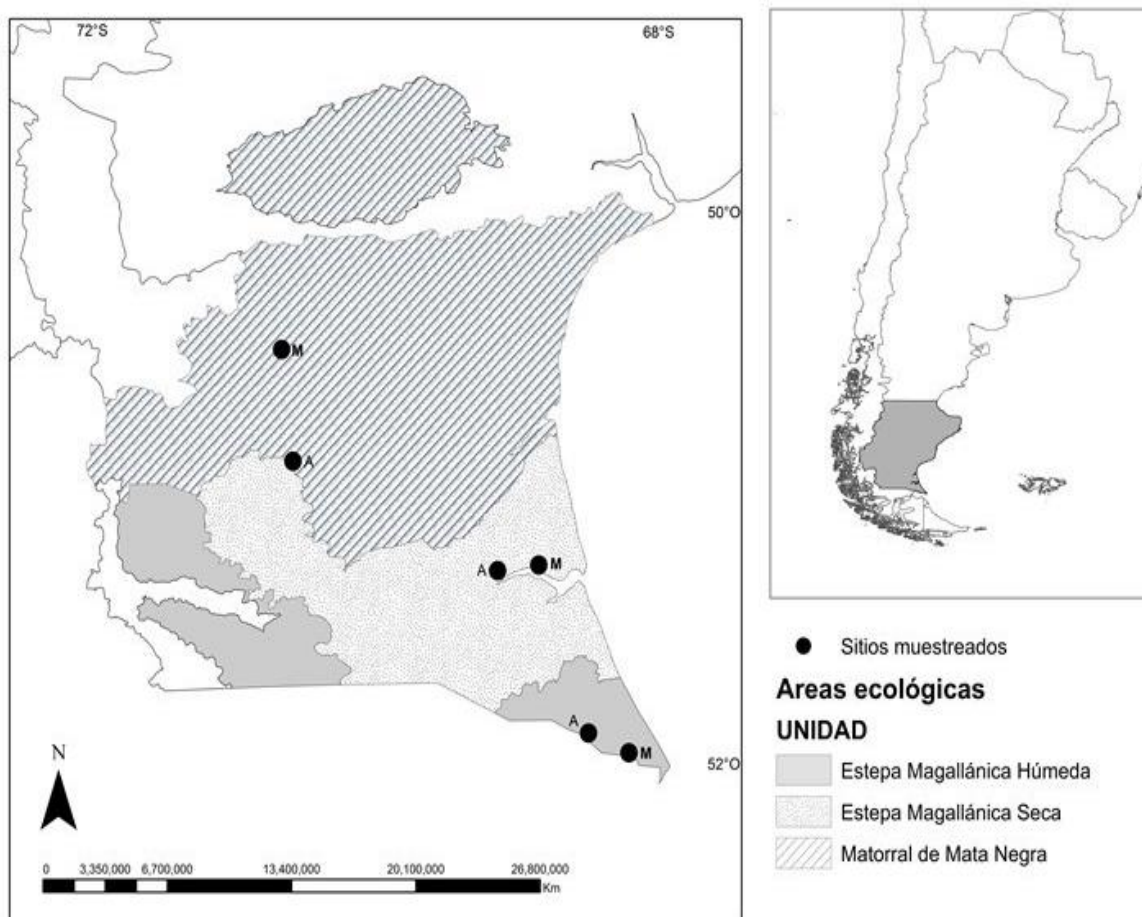
En la actualidad en Patagonia Sur Argentina, existen pocos antecedentes sobre el efecto del pastoreo, tipo de vegetación, suelo y clima sobre la microbiología de los suelos, los cuales podrían ser usados como una herramienta de monitoreo para abordar una mejor comprensión de los mecanismos subyacentes que determinan la vida microbiana en estos ecosistemas. Es por ello, que el objetivo del presente capítulo fue estudiar la respuesta de los parámetros microbiológicos como el carbono de la biomasa microbiana, la respiración biológica del suelo, abundancia de hongos y bacterias totales y los coeficientes ecofisiológicos al gradiente ambiental (climático y vegetacional) y a las cargas ganaderas ovinas contrastantes de largo plazo. En el caso particular del área ecológica Matorral de Mata Negra se evaluará la microbiología del suelo debajo del canopeo de los arbustos *Mulguraea tridens* comparado con los micrositios del interparche. En este sentido, las hipótesis fueron que carbono de la biomasa microbiana, la abundancia de hongos y bacterias totales y la respiración del suelo se correlacionan positivamente con las precipitaciones y negativamente con cargas ganaderas altas, donde la magnitud de la respuesta dependerá del área ecológica estudiada. También, se espera una respuesta de los parámetros

microbiológicos que será mayor en los micrositios del canopeo respecto a los micrositios del interparche.

## **2. 2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2. 2.1. Sitios de estudio**

La determinación de los parámetros microbiológicos de suelo se realizó en un gradiente de este-oeste que abarcó diferentes comunidades de vegetación y condiciones climáticas en el Sur de la provincia de Santa Cruz-Argentina. Estos sitios corresponden a tres áreas ecológicas: Matorral de Mata Negra (MMN), Estepa Magallánica Seca (EMS) y Estepa Magallánica Húmeda (EMH) (Fig.2.1) con intensidades contrastantes de carga animal (Moderada y Alta) de largo plazo (>20 años) (Tabla 2.1). En el ambiente MMN dominado por el arbusto *Mulguraea tridens* se evaluó la microbiología de suelos de los parches con vegetación (canopia) y entre los parches de vegetación (interparche). En cada sitio se instalaron 3 parcelas (repeticiones) de 1000 m<sup>2</sup> distanciadas unas de otras por más de 3 km y distribuidas al azar para captar la variabilidad de cada ambiente.

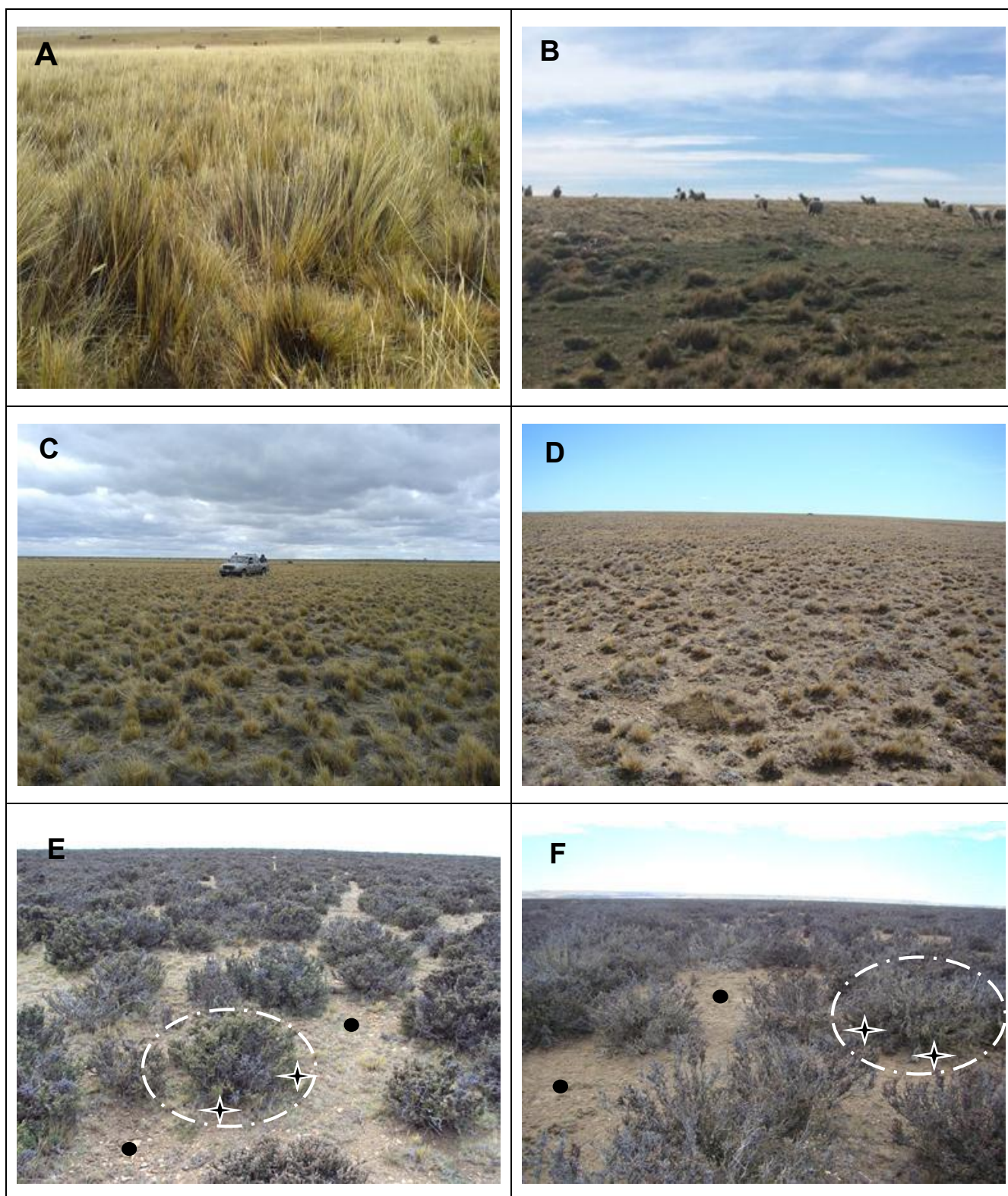


**Figura 2. 1.** Localización de los sitios de muestreo en el gradiente ambiental-vegetacional con contrastante carga animal de largo plazo Moderada (M) y Alta (A) para cada área ecológica, en Patagonia sur Argentina.

**Tabla 2. 1.** Cargas ganaderas ovinas media ( $\pm$  DE) de largo plazo (>20 años) para cada uno de los sitios de muestreo en las Áreas Ecológicas de la Provincia de Santa Cruz Argentina (Peri *et al.*, 2013).

Uso del suelo ganadero	MMN		EMS		EMH	
	Moderada	Alta	Moderada	Alta	Moderada	Alta
<b>Cargas animales (EO* ha<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup>)</b>	0,32 ( $\pm 0,06$ )	1,20 ( $\pm 0,40$ )	0,13 ( $\pm 0,02$ )	0,52 ( $\pm 0,22$ )	0,21 ( $\pm 0,05$ )	0,62 ( $\pm 0,16$ )

\*EO= equivalente ovino es el promedio de requerimientos anuales de una oveja de 49 kg de peso vivo al servicio, esquilada en septiembre, que gesta y desteta un cordero de 20 Kg vivo a los 100 días de lactancia y que tiene un consume de 530 kg MS año<sup>-1</sup>.



**Fig. 2. 2.** Sitios de muestreos en los distintos establecimientos ganaderos de la Patagonia Austral del presente estudio. Las áreas ecológicas son Estepa Magallánica Húmeda (EMH) con carga moderada A) y carga alta B), la Estepa Magallánica Seca (EMS) con carga moderada C) y carga alta D) y el Matorral de Mata Negra (MMN) con carga moderada E) y carga alta F) de manejo de los pastizales. En los sitios del MMN (E y F) se identifican los micrositios del canopeo de *Mulguraea tridens* (estrellas dentro de la periferia del dosel del arbusto) e interparche (puntos negros).

## 2. 2.2. Características climáticas, vegetación y suelo de los sitios

El gradiente ambiental de los puntos de muestreo presenta situaciones contrastantes en la fisionomía vegetal (Borrelli y Oliva, 2001), dado por las condiciones ambientales de pluviometría y temperatura. Las variables climáticas de cada sitio relacionadas a precipitación y temperatura fueron obtenidas a partir del Worldclim (Hijmans *et al.*, 2005). Mientras que las temperaturas medias anuales fueron similares en los sitios, la temperatura mínima del mes más frío varió de -0,5 °C en la EMH a -4,1 °C en el MMN. La precipitación media anual fluctuó desde 150 mm en MMN con carga moderada a 258 mm en EMH con carga alta (Tabla 2.2).

**Tabla 2.2.** Descripción de los parámetros climáticos (Temperatura (°C) y Precipitación (mm)) en los sitios de muestreo (EMH= Estepa Magallánica Húmeda, EMS= Estepa Magallánica Seca y MMN= Matorral Mata Negra) con manejo de cargas (moderadas y alta) tomadas de WorldClim (para mayor detalle ver en [http:// www.worldclim.com](http://www.worldclim.com), Hijmans *et al.*, (2005).

Variables climáticas	MMN		EMS		EMH	
	Moderada	Alta	Moderada	Alta	Moderada	Alta
Temp. media anual	6,2	6,2	6,5	6,5	6,5	6,4
Temp. media del trimestre más cálido	11,4	11,1	11,2	11,3	10,3	10,4
Temp. media en el trimestre más frío	0,4	0,7	0,9	0,9	2,4	2,1
Temp. media del trimestre húmedo	6,0	6,0	10,8	11,3	9,5	9,7
Temp. media del trimestre seco	6,9	6,9	4,7	4,8	4,4	4,4
Precip. media anual	150	164	231	217	255	258
Precip. del trimestre más húmedo	46	48	76	71	80	82
Precip. del trimestre más seco	29	32	37	36	43	43
Precip. del trimestre más cálido	35	42	76	71	79	81
Precip. en el trimestre más frío	40	42	49	45	59	58

La caracterización de la cobertura de suelo por comunidades vegetales se realizó en cada parcela con el método de puntos (Levy y Madden, 1933) con transectas de 30 m de largo y estimaciones cada 10 cm (300 puntos por transecta) dentro de las parcelas de 1000 m<sup>2</sup> (Tabla 2.3). La cobertura de suelo desnudo fluctuó de 31,3 a 3,4 % para MMN con cargas altas y EMH con cargas moderadas, respectivamente. Las coberturas de Coironal e Intercoironal presentó el gradiente MMN<EMS<EMH.

**Tabla 2.3.** ANOVA de la descripción de las coberturas vegetales (%) para las áreas ecológicas (EMH= Estepa Magallánica Húmeda, EMS= Estepa Magallánica Seca y MMN= Matorral Mata Negra) evaluadas con sus respectivas cargas ovinas de largo plazo (moderadas y altas) en los sitios de muestreo en Patagonia sur, letras distintas indican diferencias significativas (p<0.05).

Cobertura de suelo	MMN		EMS		EMH	
	Moderada	Alta	Moderada	Alta	Moderada	Alta
Suelo desnudo	29,5a	31,3a	21,3b	24,8ab	3,4c	7,2c
Mantillo	6,4c	5,7c	19,3a	18,8a	8,2c	11,4ab
Coironal	7,7c	9,0c	17,9b	18,9b	28,3a	34,5a
Intercoironal	9,8c	6,9c	25,5a	19,6b	39,7a	20,6b
Subarbusto	9,4b	11,3b	12,0b	13,6b	16,6ab	22,4a
Arbusto	37,2a	35,8a	4,0b	4,3b	3,8b	3,9b



Para caracterizar las propiedades físico-químicas de los suelos, en cada repetición (parcela de 1000 m<sup>2</sup>) de cada sitio se realizó una toma de muestras compuestas conformada por 10 submuestras de los primeros 5 cm de profundidad (sin residuos vegetales) con un cilindro (5.6 cm de diámetro). En el caso particular de MMN se muestreó para la caracterización también los dos micrositios: debajo la canopia de los arbustos de *M. tridens* y en los interparches. Los parámetros físicos y químicos variaron según las áreas ecológicas y la carga animal (Tabla 2.4). Las características de suelo tuvieron rangos de pH entre 5 y 6 dependiendo de los sitios, las texturas de los suelos son predominantemente arenosa y franco-arenosa, y con valores de carbono orgánico de suelo entre 1,27 y 3,83 % para MMN y EMH, respectivamente.

**Tabla 2.4.** Descripción de las propiedades físicas y químicas de los suelos de Patagonia Sur. Áreas ecológicas (EMH= Estepa Magallánica Húmeda, EMS= Estepa Magallánica Seca y MMN= Matorral Mata Negra) evaluadas con sus respectivas cargas ovinas de largo plazo (moderadas y altas) en Patagonia sur Argentina, letras distintas indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

Variables de suelo	MMN		EMS		EMH	
	Moderada	Alta	Moderada	Alta	Moderada	Alta
<b>Textura</b>	Franco Arenosa	Franco Arenosa	Arenosa	Arenosa	Franco Arenosa	Arenosa
<b>Densidad aparente (g/cm<sup>3</sup>)</b>	1,15bc	1,21c	0,96ab	1,07bc	0,80a	0,82a
<b>pH</b>	5,98b	5,60ab	5,60ab	5,57ab	5,20a	5,16a
<b>Carbono orgánico (%)</b>	1,27a	1,67ab	2,67bc	1,71ab	3,03c	3,83c
<b>Nt (%)</b>	0,11a	0,13ab	0,18abc	0,13ab	0,26c	0,24bc
<b>P (ppm)</b>	25,12b	25,27b	12,27a	12,40a	16,07ab	18,23ab
<b>K (meq/100g)</b>	0,41c	0,22ab	0,78d	0,16a	0,32bc	0,21ab
<b>C:N</b>	11,50a	12,80a	14,80a	13,10a	11,60a	15,90a

En los micrositios del MMN, el suelo debajo del canopeo del arbusto *M. tridens* está caracterizado por valores más altos de N total, P y K comparado con los suelos de interparche, asimismo presenta un valor más bajo de densidad aparente del suelo (Tabla 2.5).

**Tabla 2.5.** Propiedades fisicoquímicas del suelo para los micrositios canopeo e interparche de las plantas de *Mulguraea tridens* en el matorral Mata Negra. Se muestran los valores medios. Diferentes letras muestran diferencias significativas entre los microhábitats ( $p < 0.05$ ).

Variables fisico-químicas de suelo	Canopeo	Interparche
<b>Textura</b>	Franco Arenosa	Franco Arenosa
<b>Densidad Aparente (g/cm<sup>3</sup>)</b>	1,13 a	1,23 b
<b>pH</b>	5,90 a	5,68 a
<b>Carbono orgánico (%)</b>	1,54 a	1,40 a
<b>N total (%)</b>	0,14 b	0,10 a
<b>P disponible (ppm)</b>	31,67 b	18,72 a
<b>K (meq/100g)</b>	0,47 b	0,16 a
<b>C:N</b>	11,27 a	13,47 a

### **2. 2. 3. Microbiología del suelo**

Para la determinación de los parámetros microbiológicos, se tomaron 3 muestras por repetición (parcela de 1000 m<sup>2</sup>) por sitio. Las muestras estaban formadas por 10 submuestras de los primeros 5 cm de profundidad (sin residuos vegetales) con un cilindro (5.6 cm de diámetro). En el caso del estudio de micrositios en al área ecológica MMN se tomaron muestras de los dos micrositios: debajo de los arbustos (canopia) y en los espacios abiertos (interparches). Los muestreos para la determinación del carbono de la biomasa microbiana se realizaron durante dos años (2016-2017) en las cuatro estaciones (otoño, invierno, primavera y verano). Para la determinación de la respiración potencial de suelo se utilizaron las muestras tomadas en la estación de primavera. Las muestras fueron mantenidas refrigeradas a 4°C hasta su posterior procesamiento en laboratorio.

#### **2.2.3.1 Carbono de la biomasa microbiana**

Las estimaciones del C-BM se realizaron mediante el método de fumigación-extracción (Vance *et al.*, 1987). Previamente a la cuantificación de C en biomasa microbiana las muestras de suelo se tamizaron por una malla de 2 mm. Luego se tomaron dos submuestras de 50 g de peso fresco, una de éstas se colocó en vasos de precipitados de 150 ml (a fumigar) y la otra en recipientes plásticos con tapa (sin fumigar). A su vez, una sub-muestra adicional de 30 g fue tomada para determinar el peso seco. Las muestras a fumigar fueron colocadas en un desecador junto con un recipiente conteniendo 30 ml de cloroformo libre de etanol y se les aplicó vacío hasta lograr la ebullición del cloroformo, posterior a lo cual se dejó reposar en ambiente oscuro por 24 horas. Las muestras control y fumigadas fueron extraídas con 50 ml de K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,5 M, se agitaron enérgicamente durante 2 minutos y luego se colocaron en un agitador horizontal por 1 hora. Luego se realizó una digestión con solución sulfocrómica por 30 minutos a 150° C. La concentración de C de las muestras digeridas se obtuvo mediante la lectura con un espectrofotómetro (Metrolab 1500, UV y visible), previa calibración de la curva de control. La conversión de C a biomasa microbiana se realizó mediante la fórmula: C en biomasa microbiana = (Cf – Cnf)/KEC; Donde: Cf = Carbono en el extracto fumigado; Cnf = Carbono en el extracto no fumigado; KEC = constante de eficiencia de la fumigación = 0,45 (Joergensen, 1996).

### 2.2.3.2 Determinación de la abundancia de hongos y bacterias totales por qPCR

La cuantificación de abundancia de genes de bacterias y hongos totales del suelo se realizó con las muestras de primavera provenientes de los años 2016 y 2017. Se tomaron 3 muestras por sitio (n=3). Las mismas fueron tamizadas (2 mm), procesadas, acondicionadas y conservadas en ultrafreezer a -80°C hasta la extracción del ADN. La extracción de ADN total del suelo se efectuó a partir de 0,25 mg de suelo utilizando el kit comercial Powersoil DNA isolation kit (MoBio Laboratories, EE.UU) siguiendo las instrucciones del fabricante y con el paso de lisis alternativo (70 °C durante 10 minutos después de agregado la solución C1 que contiene laurilsulfato sódico). La cuantificación del ADN se realizó en un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Montchanin, EE.UU.) y posteriormente se controló con un gel de agarosa al 1% y tinción con Sybr Safe (Invitrogen) en TBE 1X. Las muestras de ADN de suelo fueron conservadas en heladera a -20°C hasta la cuantificación por qPCR. La cuantificación de la abundancia de bacterias y hongos totales de las muestras de suelo se llevó a cabo en un equipo Mx3000P qPCR (Agilent Technologies) empleando la mezcla FastStart Universal SYBR Green Master (Rox). Las reacciones (volumen final de 15 µL) se realizaron según las condiciones especificadas en la Tabla 2.6.

**Tabla 2.6.** Descripción de los reactivos empleados para la cuantificación de genes de bacterias y hongos por medio de qPCR realizados con un volumen final de reacción de 15 µL sobre la mezcla FastStart Universal SYBR Green Master.

Mezcla reactiva	Bacterias	Hongos
<b>Gen blanco</b>	16S rRNA	18S rRNA
<b>Primers</b>	Eub338/Eub518	FF390/FR1
<b>[Primers] nM</b>	0,3	0,66
<b>DMSO (%)</b>	10	5
<b>[DNA] ng/reacción</b>	2	10
<b>Perfil térmico</b>	95°C a 10'/ 40 Ciclos (95 °C a 1', 53 °C a 30", 72°C a 1')/ 72°C a 10'	95°C a 15'/ 45 Ciclos (95 °C a 1', 50 °C a 30", 72°C a 30")/ 72°C a 10'
<b>Referencia</b>	Fierer <i>et al.</i> (2005)	Prévost-Bouré <i>et al.</i> (2011)

Las curvas estándares se confeccionaron realizando diluciones seriadas al décimo de DNA genómico de *Bradyrhizobium diazoefficiens* USDA 110 ( $1.1 \times 10^3$  a  $1.1 \times 10^7$  número de copias del gen 16s rRNA), y un plásmido linealizado conteniendo la secuencia blanco amplificada de DNA genómico de *Trichoderma harzianum* ( $7.93 \times 10^4$  a  $7.93 \times 10^8$  copias del gen 18S rRNA) para bacterias y hongos, respectivamente. Las muestras de ADN de suelo, curvas estándar y negativas, se analizaron por triplicado en cada microplaca de PCR. La calidad del producto



amplificado se verificó a través del análisis de las curvas de disociación y en geles de agarosa 1% revelados con SYBR Safe. La eficiencia de las corridas estuvo dentro del rango 99-103 %, mientras que el  $R^2$  o bondad de ajuste estuvo entre 0,97 y 0,99. Los controles negativos no presentaron amplificación en ninguna de las corridas.

### **2.2.3.3 Respiración potencial del suelo y coeficientes ecofisiológicos**

La medición de  $\text{CO}_2$  resultante de la respiración potencial del suelo se realizó a través de la técnica de incubación aeróbica en condiciones óptimas de humedad y temperatura (Robertson *et al.*, 1999). Esta metodología indica que el dióxido de carbono producido a lo largo de la incubación representa un índice de la cantidad de carbono disponible para los microorganismos. La incubación de corto plazo provee información acerca del C rápidamente disponible, informando acerca de la partición de la materia orgánica del suelo. Para ello, 75 gramos de suelo tamizado (2 mm) se incubaron a capacidad de campo en un recipiente plástico dentro de un frasco de vidrio de 1 litro cerrado herméticamente. En el interior del frasco se colocó un vial con agua destilada y otro con 20 ml de hidróxido de sodio 0,2 M como trampa de dióxido de carbono. La trampa de dióxido fue muestreada a los 1,7, 14, 21 días. En cada una de estas fechas se determinó el contenido de carbono en la trampa por medio de la titulación inversa con ácido clorhídrico 0,1M, se ventiló el frasco por 30 minutos y se reemplazó la trampa de dióxido de carbono.

El cociente metabólico microbiano ( $q\text{CO}_2$ ) se determinó como la relación entre el C- $\text{CO}_2$  producto de la respiración del suelo y el C de la biomasa microbiana (Anderson y Domsch, 1990, 1993). El cociente microbiano ( $qM$ ) fue determinado como la relación C-BM/C-orgánico suelo que refleja la contribución de la biomasa microbiana al C orgánico del suelo, expresado en porcentaje (Anderson y Domsch, 1986, 1993).

### **2. 2.4. Análisis estadístico**

Los datos fueron analizados utilizando el software INFOSTAT (Di Rienzo *et al.*, 2013). A las variables de vegetación y suelo se realizó un ANOVA con un nivel de significancia de  $p < 0,05$ . Los datos de C-BM fueron analizados con ANOVA multifactorial, siendo los factores las áreas ecológicas (MMN, EMS y EMH), las cargas ganaderas de largo plazo (Moderadas y Altas), las estaciones (Otoño, Invierno, Primavera y Verano) y los años (2016 y 2017) de medición. Los datos de RBS,  $q\text{CO}_2$  y  $qM$  se realizaron un análisis de la varianza (ANOVA) de dos vías, utilizando como

factores las áreas ecológicas (MMN, EMS y EMH) y las cargas ganaderas (Moderadas y Altas). Para el análisis estadístico del número de genes de bacterias y hongos, los valores fueron transformados a  $\log_{10}$  del número de copias por gramo de suelo seco y se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) de tres vías, utilizando como factores las áreas ecológicas (MMN, EMS y EMH) y las cargas ganaderas (Moderadas y Altas) y los años (1 y 2) de medición. Para los datos de C-BM, número de genes de bacterias y hongos totales de suelo, RBS,  $qCO_2$  y qM en los micrositios del MMN se realizó un análisis de la varianza (ANOVA), utilizando como factor el micrositios con sus dos niveles del factor (canopeo vs interparche). Las diferencias significativas entre medias fueron separadas con el test de Tukey con un nivel de significancia de  $p < 0,05$ . Se determinaron índices de correlación de Pearson en análisis pareados entre las variables del suelo, clima, vegetación para C-BM, RSB,  $qCO_2$ , qM, hongos, bacterias y la relación hongos/bacterias con un valor de  $p < 0,05$  con un nivel de confianza del 95%. Luego con las variables con mayor correlación del Índice de Pearson, se realizaron regresiones con las variables RSB y C-BM.

## **2.3. RESULTADOS**

### **2.3.1 Carbono de la Biomasa Microbiana y abundancia de hongos y bacterias en ambientes de Patagonia Sur**

Los resultados demuestran que el C-BM varió significativamente ( $p < 0,05$ ) según las distintas áreas ecológicas, las cargas ganaderas ovinas y las estaciones del año, lográndose detectar interacciones entre los principales factores. La abundancia de hongos totales (número de copias del gen 18S rDNA) y la relación hongos/bacterias (18S/16S rDNA) en los suelos evaluados varió ( $p < 0,05$ ) en las distintas áreas ecológicas. Los años de muestreo influyeron con diferencias en el C-BM y el N° de copias de genes. Las interacciones entre factores se detectaron en áreas\*año en 16SrDNA y áreas\*carga en 18S rDNA (Tabla 2.7).

El C-BM del suelo en MMN presentó el menor valor, EMH el valor más alto y EMS un valor intermedio (Tabla 2.7) Considerando que el carbono de la biomasa microbiana es una de las fracciones lábiles y activa de la materia orgánica presente en el suelo, encontramos que el C-BM varió ( $p < 0,05$ ) en las distintas estaciones del año (Otoño, Invierno, Primavera y Verano), donde la estación de otoño y primavera contrastaron los valores más bajos y altos, respectivamente. Asimismo, los resultados obtenidos muestran que las cargas ganaderas ovinas afectaron significativamente ( $p < 0,05$ ) el

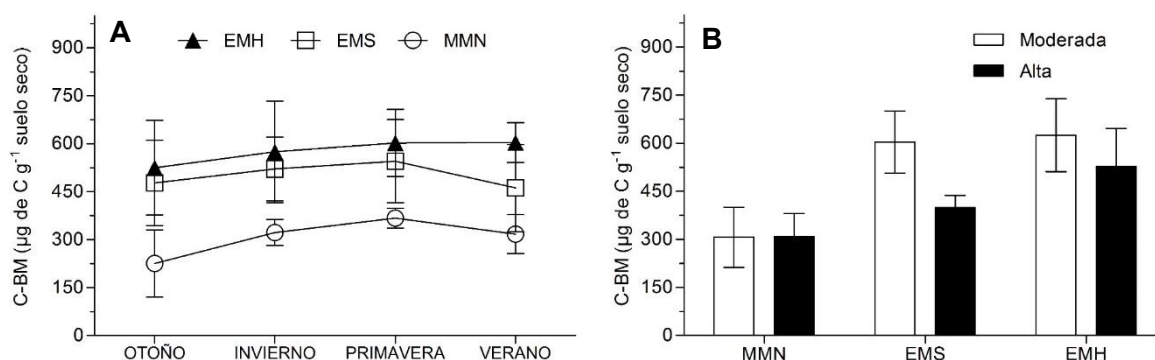
C-BM, siendo los valores más bajos en los campos con carga alta respecto a los de carga moderada (Tabla 2.7). Los valores de hongos totales de suelo tuvieron el gradiente de EMH>EMS>MMN con significancia estadística ( $p<0,05$ ). Respecto a los años de muestreo, hubo mayor abundancia de bacterias en el año 2016 que en el 2017 y a la inversa ocurrió con la abundancia de hongos totales del suelo, en ambos casos con diferencias significativas ( $p<0,05$ ). Lo cual estuvo afín con el mayor valor en la relación hongo/bacterias que se obtuvo en el año 2017 en nuestros resultados dado por esta relación inversa.

**Tabla 2.7.** Variables microbiológicas del suelo. Carbono de la biomasa microbia = C-BM ( $\mu\text{g}$  de C/g suelo seco) y bacterias totales ( $\text{N}^\circ$  de copias de genes 16S rDNA) y hongos totales ( $\text{N}^\circ$  de copias de genes 18S rDNA) y hongos/bacterias (genes 18S/16S rDNA) en las distintas áreas ecológicas (EMH= Estepa Magallánica Húmeda, EMS= Estepa Magallánica Seca y MMN= Matorral Mata Negra) y cargas ganaderas de largo plazo ( $>20$  años) (Moderado y Alta), durante dos años de muestreo continuo (2016 y 2017). Con mediciones estacionales para el C-BM (Otoño, Invierno, Primavera y Verano) en ambientes de Patagonia Sur Argentina. Letras distintas indican diferencias significativas ( $p$  Valor  $< 0,05$ ).

Factores	C-BM	Bacterias	Hongos	Hongos/Bacterias
<b>Áreas</b>				
MMN	308,14 a	6,00E+09 a	3,00E+06 a	0,05 a
EMS	501,32 b	9,00E+09 a	5,00E+06 b	0,07 ab
EMH	576,58 c	8,00E+09 a	7,00E+06 b	0,12 b
<b>Carga</b>				
Moderada	511,83 a	8,00E+09 a	5,00E+06 a	0,07 a
Alta	412,2 b	7,00E+09 a	5,00E+06 a	0,09 a
<b>Estaciones</b>				
Otoño	409,19 a			
Invierno	472,81 b			
Primavera	505,14 c			
Verano	460,92 b			
<b>Año</b>				
1 (2016)	474,22 a	9,00E+09 b	4,00E+06 a	0,04 a
2 (2017)	449,81 b	7,00E+09 a	6,00E+06 b	0,12 b
<b>Interacciones</b>				
Áreas*Cargas	<b>&lt;0,0001</b>	0,349	<b>0,004</b>	0,065
Áreas*Estaciones	<b>&lt;0,0001</b>			
Áreas *Años	<b>&lt;0,0001</b>	<b>0,023</b>	0,504	0,149
Cargas*Años		0,185	0,588	0,559
Carga*Estaciones	<b>&lt;0,0001</b>			

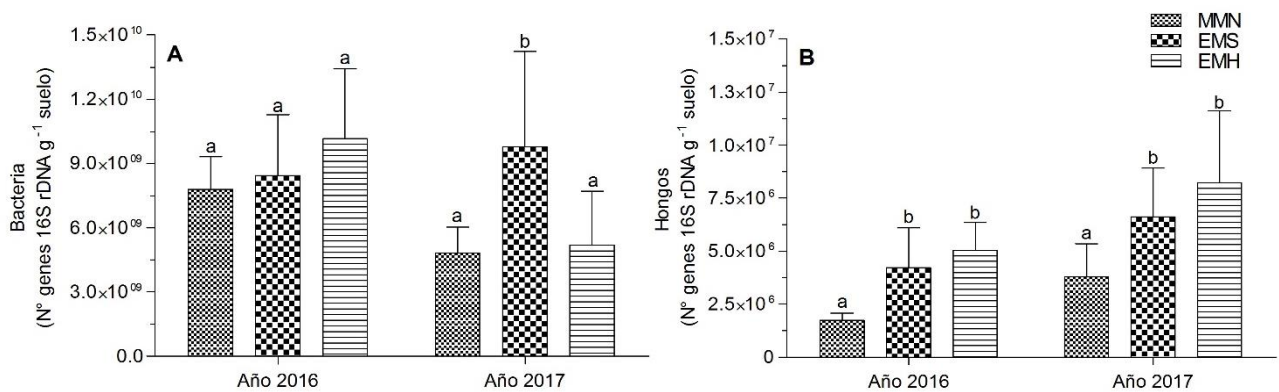
### 2.3. 2 Interacciones entre factores sobre la respuesta del C-BM, hongos y bacterias

La interacción entre áreas ecológicas y estaciones del año para la variable del C-BM fueron estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ). El área ecológica MMN en todas las estaciones del año presentó los valores más bajos ( $225,3 \mu\text{g}$  de C-BM/g suelo) diferenciándose de EMH en las cuatro estaciones del año (Fig. 2.3 A). La EMS tuvo valores intermedios en las estaciones sin diferencias significativas respecto a EMH y MMN. La interacción entre áreas ecológicas y carga animal para el C-BM, determinó que mientras en MMN ambas cargas animales no presentaron diferencias ( $p < 0,05$ ) con valores bajos, en EMH y EMS la carga moderada presentó mayores valores en C-BM que las cargas altas. Además, se determinó que en la EMS la carga alta de largo plazo generó una mayor disminución del C-BM comparado a la EMH (Fig. 2.3 B).



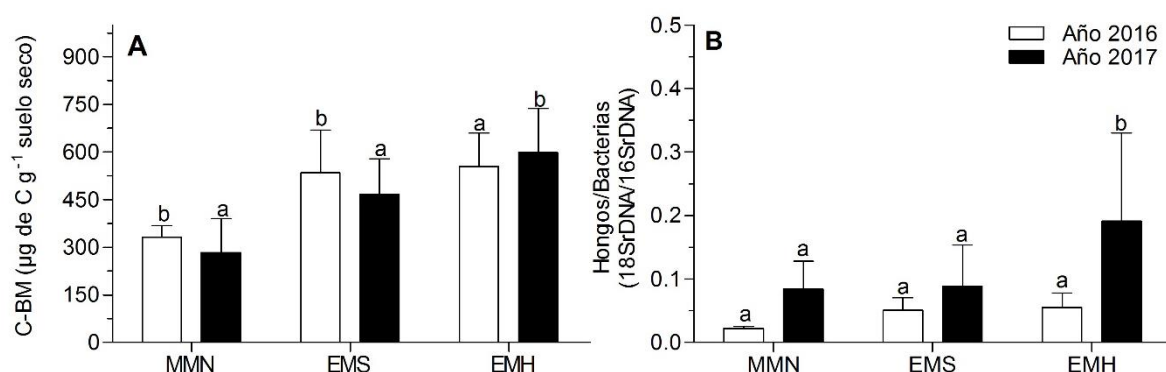
**Figura 2.3.** Carbono de la biomasa microbiana (C-BM) mostrando la variación estacional (A) y los efectos del factor cargas ganaderas moderadas y altas (B) para cada una de las áreas ecológicas (EMH= Estepa Magallánica Húmeda, EMS= Estepa Magallánica Seca y MMN= Matorral Mata Negra) de los pastizales de Patagonia sur Argentina. Valores medios y barras con el desvío estándar son graficados.

La interacción entre áreas ecológicas y años para el número de copias de genes 16S rDNA (bacterias totales) y 18S rDNA (hongos totales), determinó una mayor abundancia de bacterias que de hongos en el suelo (Fig. 2.4). Las bacterias totales del suelo tuvieron similares valores el año 1 en las áreas ecológicas, y en el año 2 se observó el mayor número en la EMS (Fig. 2.4 A). Los valores de hongos totales en el suelo tuvieron el gradiente de  $\text{EMH} > \text{EMS} > \text{MMN}$  en ambos años (Fig. 2.4 B).



**Figura 2.4.** Comunidades de microorganismos en los suelos de la Patagonia Sur Argentina. Se muestran valores medios y la desviación estándar de: A) N° de copias de genes 16S rDNA (bacterias totales) y B) N° de copias de genes 18S rDNA (hongos totales) para las distintas áreas ecológicas (EMH) = Estepa magallánica húmeda, (EMS) = Estepa magallánica seca y (MMN) = Matorral de mata negra y para los años de muestreo 2016 y 2017. Letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

La respuesta del C-BM interanual interactuó ( $p < 0,05$ ) con las áreas ecológicas, determinando que en MMN y EMS presenten valores más altos en el año 1 respecto al año 2 de medición. Sin embargo, esa respuesta fue inversa para la EMH donde el año 1 tuvo un valor significativamente más bajo (554,6  $\mu\text{g}$  de C/g suelo seco) que el año 2 (598,5  $\mu\text{g}$  de C/g suelo seco) (Fig. 2.5 A). La relación 18S/16S rDNA (hongos/bacterias) de los suelos presentaron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre las distintas áreas ecológicas y entre años. Las relaciones fueron menores en el año 1 comparado al año 2, en todas las áreas ecológicas. Se pudo observar que en el MMN tuvo la menor relación respecto a las demás áreas ecológicas en el año 1 y que la EMH en el año 2 presentó el mayor valor (Fig. 2.5 B).



**Figura 2.5.** Variación interanual del carbono de la biomasa microbiana (C-BM) (A) y de la relación hongos/bacterias (del N° de copias de genes  $\text{g}^{-1}$  suelo seco 18S/16S rDNA) (B) para las áreas ecológicas Estepa Magallánica Húmeda (EMH), Estepa Magallánica Seca (EMS) y el Matorral Mata Negra (MMN) de los pastizales de Patagonia sur Argentina. Año 1 y año 2 corresponden a las fechas de muestreo 2016 y 2017. Valores medios y barras con el desvío estándar son mostrados.

### 2.3. 3 Respiración biológica de suelo, coeficiente metabólico y cociente microbiano de suelo en los ambientes de Patagonia Sur

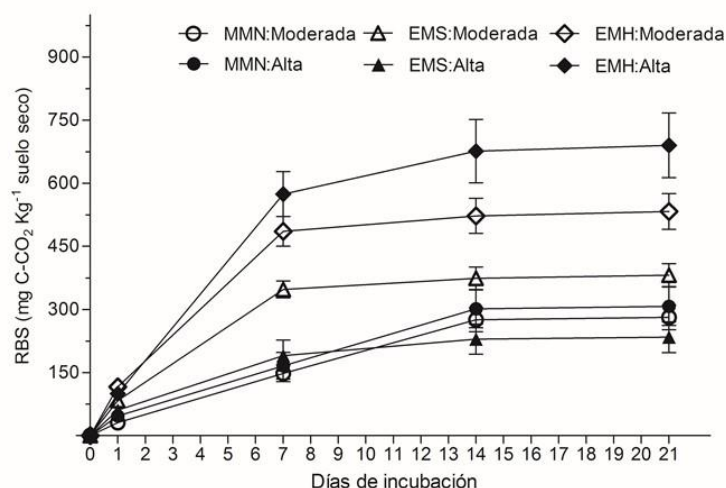
La RBS,  $qCO_2$  y  $qM$  difirieron significativamente ( $p < 0,05$ ) entre las distintas áreas ecológicas evaluadas (Tabla 2.8). La RBS fue mayor en la EMH comparado con la EMS y MMN. El  $qCO_2$  que describe la eficiencia de la biota del suelo en relación a su actividad y su biomasa, presentó a la EMS con el menor valor y MMN junto con la EMH los valores más altos. Por otra parte, el  $qM$  presentó a la EMH con el menor valor respecto a la EMS y el MMN, el cual varió ( $p < 0,05$ ) en función de la carga ganadera ovina, donde la carga alta presentó un menor valor respecto a la carga moderada. Asimismo, se logró detectar interacciones entre los factores (Tabla 2.8).

**Tabla 2.8.** ANOVA de la tasa de respiración biológica de suelo (RBS) (mg de C-CO<sub>2</sub>/Kg suelo seco/día), cociente metabólico ( $qCO_2$ ) ( $\mu gC-CO_2$ / mg C-BM/ día) y cociente microbiano ( $qM$ ) (%) en las distintas áreas ecológicas (EMH= Estepa Magallánica Húmeda, EMS= Estepa Magallánica Seca y MMN= Matorral Mata Negra) y cargas ganaderas de largo plazo (>20 años) (moderado y alto) en los pastizales de Patagonia Sur Argentina.

Factores		RBS	$qCO_2$	$qM$
<b>Áreas</b>				
	MMN	37,09 a	0,13 b	2,43 b
	EMS	45,27 a	0,09 a	2,34 b
	EMH	88,04 b	0,16 b	1,75 a
<b>Carga</b>				
	Moderada	58,18 a	0,12 a	2,5 b
	Alta	55,42 a	0,13 a	1,84 a
<b>Interacciones</b>				
	Áreas*Carga	<0,0001	0,027	<0,0001

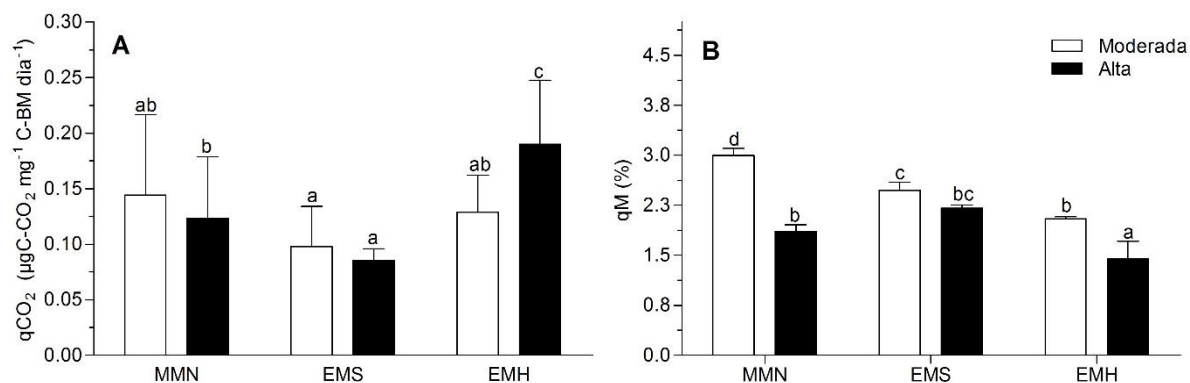
### 2.3. 4 Interacciones entre factores en la respuesta de la RBS, $qCO_2$ y $qM$

La interacción entre áreas ecológicas y carga animal para la RBS ( $p < 0,05$ ) determinó que mientras en la EMH la carga animal alta presentó los valores más altos durante todo el periodo de incubación (689,9 mg C-CO<sub>2</sub>/Kg de suelo seco al día 21) seguido por la carga moderada (532,9 mg C-CO<sub>2</sub>/Kg de suelo seco al día 21), la EMS presentó una respuesta inversa (carga moderada > carga alta) (Fig. 2.6). En MMN luego del día 7 de incubación, los valores de RBS en ambas cargas animales superaron a la carga alta de EMS.



**Figura 2.6.** Valores medios y desvío estándar de respiración biológica de suelo (mg C-CO<sub>2</sub>/Kg de suelo seco) en los sitios (EMH:ALTA= Estepa Magallánica Húmeda Carga Alta, EMS:ALTA= Estepa Magallánica Seca Carga Alta, MMN:ALTA= Matorral Mata Negra Carga Alta, EMH:MODERADA= Estepa Magallánica Húmeda Carga Moderada, EMS: MODERADA = Estepa Magallánica Seca Carga Moderada y MMN: MODERADA = Matorral Mata Negra Carga Moderada) en función de los días de incubación para los pastizales de Patagonia sur Argentina.

La interacción áreas ecológicas y carga animal para el qCO<sub>2</sub> mostró diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) (Tabla 2.8). Mientras que en la EMS ambas cargas ganaderas (alta y moderada) tuvieron los valores más bajos sin diferencias significativas (0,09 y 0,10  $\mu\text{gC-CO}_2/\text{mg C-BM/ día}$ ), los valores más altos se obtuvieron en la EMH con carga Alta (0,19  $\mu\text{gC-CO}_2/\text{mg C-BM/ día}$ ) que difirió de la carga moderada (0,13  $\mu\text{gC-CO}_2/\text{mg C-BM/ día}$ ) (Fig. 3.9) (Fig. 2.7 A). La interacción ( $p < 0,05$ ) entre áreas ecológicas y carga animal para el qM de suelo, determinó que en la EMH con su carga ganadera alta tuvo el valor más bajo (1,45 %), MMN con la carga baja presentó el valor más alto (2,99 %) y los valores medios estuvieron dados por la carga alta de EMS y MMN y las cargas bajas de EMS y EMH (Fig. 2.7 B).



**Figura 2.7.** Coeficientes ecofisiológicos microbianos en los pastizales de Patagonia sur, coeficiente metabólico (qCO<sub>2</sub>) (A) y cociente microbiano (qM) (B) para las áreas ecológicas Estepa Magallánica Húmeda (EMH), Estepa Magallánica Seca (EMS) y Matorral Mata Negra (MMN) con sus respectivas carga ganaderas ovinas de largo plazo (Alta y Moderada). Valores medios y sus desvío estándar son mostrados.

### 2.3. 5 Relaciones de las variables microbiológicas con las ambientales, suelos y vegetación

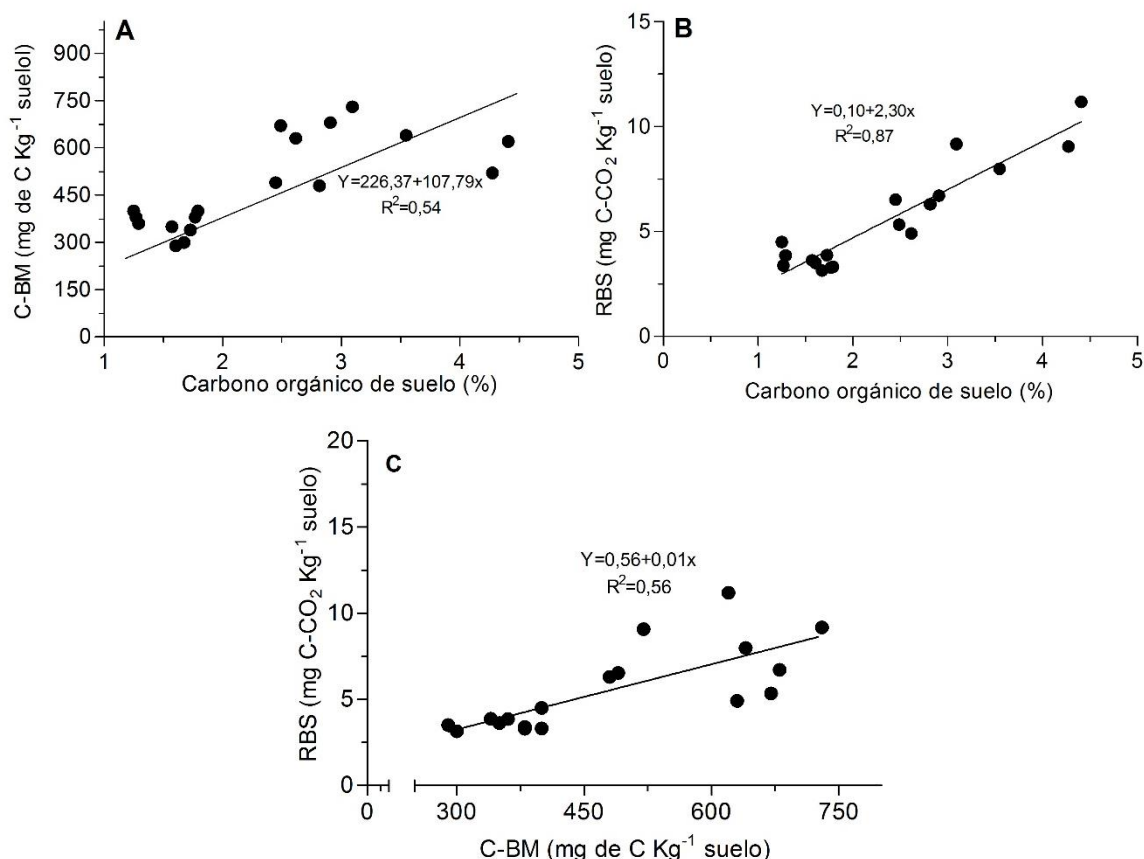
Las variables microbiológicas evaluadas presentaron correlaciones significativas ( $p < 0,05$ ) entre sí y con algunas variables de suelo, vegetación y ambientales. El C orgánico del suelo, N total, la precipitación media anual y temperatura media anual tuvieron una correlación positiva con el C-BM, RBS, qCO<sub>2</sub> y la abundancia de hongos totales de suelo. Sin embargo, el P, la densidad aparente de suelo, las cargas ganaderas y la cobertura de suelo desnudo tuvieron una correlación negativa con dichas variables (Tabla 2.9).

**Tabla 2.9.** Índices de correlación de Pearson del C-BM, RBS, qCO<sub>2</sub>, qM, Hongos, Bacterias y Hongos/Bacterias con las variables de suelo, vegetación, clima y biológicas para los pastizales de Patagonia Sur Argentina. (\*) Determina la significancia con un  $p < 0,05$ .

Variables	C-BM	RBS	qCO <sub>2</sub>	qM	Hongos	Bacterias	Hongos / Bacterias
C orgánico	<b>0,73*</b>	<b>0,93*</b>	<b>0,53*</b>	<b>-0,66*</b>	<b>0,59*</b>	0,19	0,35
Nitrógeno Total	<b>0,72*</b>	<b>0,82*</b>	0,30	<b>-0,51*</b>	<b>0,50*</b>	0,09	0,33
C/N	0,32	0,39	0,41	-0,37	0,21	0,28	0,02
P	<b>-0,52*</b>	-0,24	0,35	0,13	<b>-0,58*</b>	-0,45	-0,23
K	<b>0,58*</b>	0,05	-0,12	<b>0,50*</b>	0,11	0,40	-0,19
pH	-0,40	<b>-0,58*</b>	-0,35	<b>0,69*</b>	<b>-0,48*</b>	0,21	<b>-0,46*</b>
Densidad Aparente	<b>-0,79*</b>	<b>-0,89*</b>	-0,35	0,45	<b>-0,57*</b>	-0,25	-0,40
MAT	<b>0,66*</b>	0,40	-0,25	-0,20	<b>0,59*</b>	0,46	0,21
MAP	<b>0,73*</b>	<b>0,74*</b>	0,14	<b>-0,55*</b>	<b>0,75*</b>	0,32	<b>0,46*</b>
Cargas ganaderas	<b>-0,60*</b>	-0,29	0,18	-0,42	-0,40	-0,28	-0,10
Suelo desnudo	<b>-0,69*</b>	<b>-0,85*</b>	-0,35	<b>0,51*</b>	<b>-0,67*</b>	-0,17	<b>-0,50*</b>
C-BM		<b>0,75 *</b>	0,17	-0,12	<b>0,56*</b>	<b>0,51*</b>	0,17
RBS			<b>0,62 *</b>	<b>-0,55*</b>	<b>0,56*</b>	0,19	0,37
qCO <sub>2</sub>				-0,38	0,14	-0,24	0,27
qM					-0,30	0,09	-0,31
Hongos Totales						0,12	<b>0,79*</b>
Bacterias Totales							-0,38



El carbono orgánico del suelo explicó el 87 % de la variabilidad observada en la respiración del suelo y el 54 % para el C-BM ( $p < 0,05$ ). Con ambas variables se obtuvo una relación lineal positiva (Fig. 2.8 A B). La RBS se relacionó de manera lineal y positiva con el C-BM, ello fue explicado en un 54 % para los suelos de los pastizales de Patagonia Sur (Fig. 2.8 C).



**Figura 2.8.** Relaciones de carbono orgánico del suelo con C-BM = carbono de la biomasa microbiana (A) y la RBS = respiración biológica del suelo (B) y la relación entre el C-BM y RBS (C) para los suelos de los pastizales de Patagonia sur Argentina.

### 2.3. 6. Microbiología del suelo en los micrositios del MMN

El área ecológica Matorral de Mata Negra (*Mulguraea tridens*) presenta la particularidad de formar zonas donde el canopeo del arbusto *Mulguraea tridens* genera un microclima distinto a los espacios denominados interparche. Los resultados del C-BM y RBS evaluados en el área de MMN mostraron valores más alto ( $p < 0,05$ ) en el suelo bajo la influencia del canopeo de los arbustos en comparación al micrositio interparche (Tabla 2.10). En cambio, las bacterias y hongos totales de suelo, el  $qCO_2$  y  $qM$  en los micrositios no se diferenciaron estadísticamente, aunque pudo observarse

una tendencia a valores superiores en los micrositios del canopeo del arbusto *Mulguraea tridens*.

**Tabla 2.10.** Propiedades microbiológicas del suelo en los micrositios del canopeo e interparche que genera el arbusto *Mulguraea tridens* en el área ecológica Matorral de mata negra. Se muestran los valores medios. Las letras distintas indican significancia estadística ( $p < 0.05$ ).

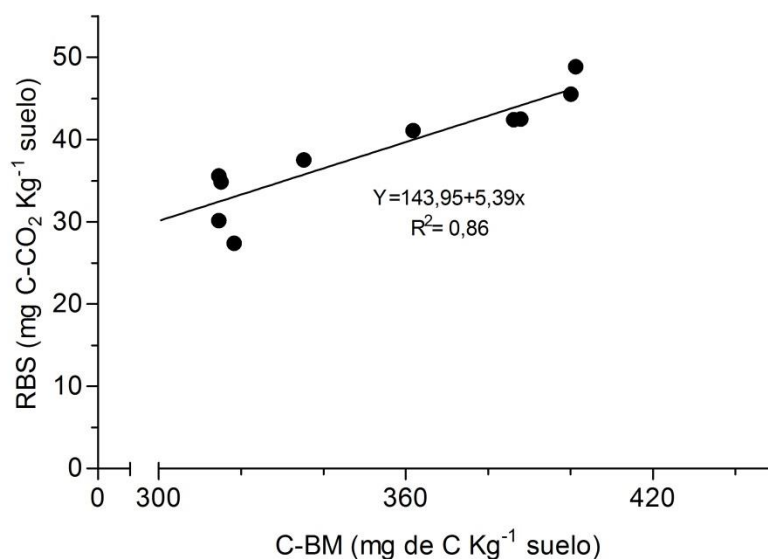
Parámetros microbiológicos del suelo (*)	Canopeo	Interparche
<b>C-BM</b> ( $\mu\text{g de C g}^{-1}$ suelo seco)	<b>328,62 b</b>	<b>287,66 a</b>
<b>Bacterias</b> ( $\text{N}^{\circ}$ copias de genes $\text{g}^{-1}$ suelo seco)	5,3E+09 a	4,5E+09 a
<b>Hongos</b> ( $\text{N}^{\circ}$ copias de genes $\text{g}^{-1}$ suelo seco)	4,8E+06 a	3,5E+06 a
<b>Hongos/Bacterias</b>	0,10 a	0,07 a
<b>RBS</b> ( $\text{mg de C-CO}_2 \text{ Kg}^{-1}$ suelo seco $\text{día}^{-1}$ )	<b>42,05 b</b>	<b>32,13 a</b>
<b>qCO<sub>2</sub></b> ( $\mu\text{gC-CO}_2 \text{ mg}^{-1}$ C-BM $\text{día}^{-1}$ )	0,14 a	0,13 a
<b>qM</b> (%)	2,18 a	2,13 a

(\*) C-BM: Carbono de la biomasa microbiana; Bacterias: (copias de genes 16S rDNA); Hongos: (copias de genes 18S rDNA); RBS: Respiración biológica del suelo; qCO<sub>2</sub>: coeficiente metabólico microbiano; qM: cociente microbiano.

Los parámetros microbiológicos evaluados presentaron correlaciones significativas ( $p < 0,05$ ) con las variables de suelo y entre las mismas variables medidas. El N total, P, K y pH tuvieron una correlación positiva con las variables microbiológicas como ser, el C-BM, RBS, qCO<sub>2</sub> y la abundancia de bacterias totales de suelo. Sin embargo, la densidad aparente de suelo y la relación C/N tuvieron una correlación negativa con las variables C-BM, RBS y qCO<sub>2</sub>. Además, se encontró relaciones entre las variables de C-BM, RBS, qCO<sub>2</sub>, qM, hongos totales de suelos y la relación hongo/bacterias para los suelos del matorral de *M. tridens* (Mata Negra) (Tabla 2.11). El carbono de la biomasa microbiana y la respiración biológica del suelo tuvieron una relación lineal positiva ( $p < 0,05$ ), el cual fue explicado en un 86 % para ambas variables (Fig. 2.9) en los suelos del Matorral de Mata Negra de *M. tridens*.

**Tabla 2.11.** Índices de correlación de Pearson del C-BM, RBS, qCO<sub>2</sub>, qM, Hongos, Bacterias y Hongos/Bacterias con las variables de suelo y biológicas para el Matorral de Mata Negra (*M. tridens*) de Patagonia Sur Argentina. (\*) Determina la significancia con un  $p < 0,05$ .

Variables	C-BM	RBS	qCO <sub>2</sub>	qM	Hongos	Bacterias	Hongos / Bacterias
<b>C orgánico</b>	0,30	0,12	0,19	-0,24	-0,17	<b>0,76*</b>	<b>-0,56*</b>
<b>Nitrógeno Total</b>	<b>0,68*</b>	<b>0,60*</b>	<b>0,56*</b>	0,07	0,17	<b>0,64*</b>	-0,22
<b>C/N</b>	<b>-0,63*</b>	<b>-0,76*</b>	<b>-0,58*</b>	-0,37	-0,43	0,03	-0,36
<b>P</b>	<b>0,74*</b>	<b>0,72*</b>	<b>0,63*</b>	0,20	0,38	0,52	-0,01
<b>K</b>	<b>0,68*</b>	<b>0,76*</b>	0,47	0,33	<b>0,65*</b>	0,15	0,41
<b>pH</b>	<b>0,67*</b>	<b>0,65*</b>	0,49	<b>0,67*</b>	<b>0,59*</b>	0,05	<b>0,62*</b>
<b>Densidad Aparente</b>	<b>-0,61*</b>	-0,48	-0,23	0,24	-0,48	-0,19	-0,32
<b>C-BM</b>		<b>0,93*</b>	0,54	0,50	<b>0,70*</b>	0,44	0,45
<b>RBS</b>			<b>0,61*</b>	0,48	<b>0,62*</b>	0,19	0,48
<b>qCO<sub>2</sub></b>				0,45	0,49	0,31	0,31
<b>qM</b>					0,53	0,09	<b>0,60*</b>
<b>Hongos Totales</b>						0,20	<b>-0,80*</b>
<b>Bacterias Totales</b>							-0,34



**Fig. 2.9.** Relación del carbono de la biomasa microbiana (C-BM) y la respiración biológica del suelo (RBS) en suelos del arbusto *Mulguraea tridens* en ambientes de Patagonia Sur Argentina.

## 2.4. DISCUSIÓN

Los resultados del presente capítulo muestran los primeros resultados sobre microbiología del suelo en sitios de la Patagonia Sur Argentina. Encontramos que factores bióticos y abióticos, como el clima a través de la temperatura y la precipitación, las comunidades vegetales y las características del suelo modulan la estructura y función microbiana en cada una de las áreas ecológicas. Por otro lado, la alta intensidad de pastoreo disminuyó el C-BM y el qM, siendo esto dependiente de las áreas ecológicas al variar los valores en magnitud de su respuesta. Además, la intensidad de carga alta del pastoreo afectó indirectamente a la comunidad microbiana del suelo a través de sus impactos en las plantas, lo que limita los sustratos (hojarasca y rizodeposición) que sirven para el crecimiento microbiano. Finalmente, hubo una dinámica estacional e interanual en el C-BM y las comunidades de bacterias y hongos, que se atribuyeron a la temperatura y principalmente a la precipitación, estos factores climáticos estimulan un mayor crecimiento y actividad en las plantas, proporcionando indirectamente mejoras en el microbioma del suelo. Los resultados indican que el efecto de la intensidad de pastoreo en las comunidades microbianas del suelo depende en gran medida de las características particulares de cada área ecológica definida en el gradiente ambiental por factores bióticos y abióticos.

#### **2.4. 1 Carbono de la Biomasa Microbiana (C-BM)**

Este estudio presenta uno de los primeros resultados sobre el carbono de la biomasa microbiana en los suelos de pastizales de Patagonia Sur de Argentina. Las áreas ecológicas evaluadas tuvieron respuestas diferentes sobre el C-BM, a las condiciones climáticas, vegetación y suelo. Los niveles de C-BM en los suelos estudiados variaron en las tres áreas ecológicas desde 308,1 a 576,6  $\mu\text{g}$  de C-BM/g suelo. Insam *et al.* (1989) al estudiar el C-BM en regiones climáticas contrastantes en Canadá y Estados Unidos observaron que las respuestas de la microbiología de los suelos fueron influenciada por la temperatura, precipitación y evaporación del suelo en un gradiente de precipitación (Este a Oeste) y de temperatura (Norte a Sur). Sin embargo, Zhou *et al.* (2016) informaron una débil relación entre los pools de carbono y la humedad del suelo dado por la precipitación media anual. En nuestro estudio, el gradiente climático determinó el mayor valor de C-BM en EMH, el cual coincide con una mayor precipitación media anual (Tabla 2.2). Austin *et al.* (2004) señalan que la distribución temporal de la precipitación y la variación de los eventos de precipitación estacional, puede regular los procesos microbianos. Siendo la precipitación anual la variable que representa la mayor variabilidad interanual en la producción primaria neta para sitios de regiones áridas-semiáridas (Briggs y Knapp, 1995; Jobbágy *et al.*, 2002), los procesos microbianos del suelo también responden a la temperatura (Fierer *et al.*, 2003; Cookson *et al.*, 2007). Esto fue respaldado en nuestros resultados al encontrar una correlación positiva del C-BM con la temperatura y las precipitaciones medias anuales (Tabla 2.9). Las comunidades edáficas del suelo fueron también en parte controladas y condicionadas por las fisionomías vegetales de las tres áreas ecológicas evaluadas. Las comunidades vegetales determinan el aporte de material vegetal (cantidad y calidad) que ingresa al suelo, que repercuten en las características del suelo (Tabla 2.4). La mayor cobertura vegetal crea un ambiente que promueve la biomasa y actividad microbiana (Goberna *et al.*, 2007). Por lo tanto, contrastando la cobertura vegetal entre áreas ecológicas (Tabla 3), los resultados de C-BM determinaron una respuestas en el siguiente orden EMH > EMS > MMN, con valores superiores en los ambientes más esteparios comparado al sitio de matorral. Sin embargo, Kieft (1994) en ambientes semiáridos obtuvo un mayor C-BM en matorrales que en pastizales, dados por el aporte de material vegetal sumado a los efectos microclimáticos que proporcionan los arbustos en ambientes más tropicales, lo cual contrasta con los resultados de MMN obtenidos en nuestro estudio por su

característica de un ambiente semiárido-frio. Sparling (1992) describió la estrecha relación entre el C-BM y los pools de carbono del suelo en los ecosistemas. Los valores de materia orgánica para cada área ecológica (Tabla 2.4) describen una relación con el C-BM ( $EMH > EMS > MMN$ ) coincidente con la cobertura vegetal y precipitación. Esto fue confirmado en nuestro estudio con una relación lineal positiva entre el carbono orgánico del suelo y el C-BM (Fig. 2.8 A). Esta misma relación positiva fue reportado para suelos de ecosistemas de pastizales y bosques de la Patagonia Chilena (Dube *et al.*, 2009), pastizales de toda Irlanda (Richter *et al.*, 2018), ecosistemas arbóreo de suelos arenosos (Lee y Jose, 2003) y la misma tendencia de correlación para pastizales templados (Cui y Holden, 2015). Estas relaciones observadas afirman la idea de que el C orgánico es de vital importancia para los microorganismos del suelo y su dependencia como fuente de recurso para la biota edáfica en diferentes ecosistemas.

Los resultados han mostrado una disminución en la biomasa microbiana del suelo en áreas con alta carga animal de manejo del pastoreo, que coinciden con otros estudios de pastizales (Holt, 1997; Liu *et al.*, 2015; Zhou *et al.*, 2017). Peri (2011) informó que el contenido de carbono en los pastizales disminuyó de  $130 \text{ Mg C ha}^{-1}$  con manejo de bajas cargas de pastoreo ( $0,10 \text{ ovejas ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$ ) a  $50 \text{ Mg C ha}^{-1}$  con altas cargas de pastoreo ( $0,70 \text{ ovejas ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$ ), principalmente debido a una disminución en la cobertura vegetal y la pérdida de carbono del suelo como resultado de la erosión debido por los fuertes vientos. Sin embargo, hay estudios que muestran un aumento en el C-BM y otros que no muestran cambios en la biomasa microbiana (Hamilton y Frank, 2001; Liu *et al.*, 2012; Lin *et al.*, 2017). Las cargas ganaderas de manejo del pastoreo en los pastizales puede afectar indirectamente el C-BM a través de cambios en la disponibilidad de sustrato para microorganismos (bosteos, orina y material vegetal) y cambios en la cantidad y calidad de exudados de raíces y deposición de hojarasca (Bardgett *et al.*, 1998; Peri *et al.*, 2016, 2018). Además, las cargas ganaderas ovinas en los manejos del pastoreo conducen a una selectividad por parte del ganado que cambia la estructura de la comunidad de plantas, lo que resulta en diferencias en la calidad de las reservas de carbono que ingresan al suelo (Augustine y McNaughton, 1998; Bagchi y Ritchie, 2010). En los sitios de las áreas ecológicas, las altas cargas ganaderas de manejo del pastoreo tiende a aumentar el porcentaje de suelo desnudo (Tabla 2.3), lo que disminuiría el carbono que ingresa al suelo y la humedad del suelo, lo que resulta en una mayor evaporación y en consecuencia

impacta en el crecimiento de la comunidad microbiana del suelo (Northup *et al.*, 1999). Apoyando esto, encontramos una relación negativa entre la cobertura del suelo desnudo y el C-BM (Tabla 2.9). La intensidad de pastoreo en cada área ecológica tuvo diferentes respuestas en el C-BM en sus interacciones entre las áreas ecológicas y las cargas ganaderas, dada por las características de cada sitio y su resiliencia ante la perturbación. Mientras que en el área del matorral de MMN el C-BM se comportó indistintamente a las cargas ganaderas, la magnitud del cambio en el C-BM fue diferencial en las estepas EMS y EMH. En el sitio del MMN, las cargas ganaderas ovinas no cambiaron el C-BM, esto podría deberse al hecho de que en ambientes áridos (150 mm de lluvia año) hay una mayor cobertura de plantas leñosas (Tabla 2.3) que tienen carbono recalcitrante en su detrito orgánico que llega al suelo, lo que reduciría las tasas de descomposición y produciría indirectamente una desaceleración en los ciclos de nutrientes y una disminución de la biomasa microbiana del suelo, independientemente de la intensidad del pastoreo en estas áreas ecológicas (Ritchie *et al.*, 1998; Landgraf y Klose, 2002). En la EMS el efecto de la carga alta produjo una disminución mayor del C-BM en comparación a la EMH, teniendo esta última una mayor precipitación media anual (Tabla 2.2). Ha sido demostrado que en sitios con una precipitación media anual cercana a los 600 mm, la mayor biomasa microbiana activa y fracciones de materia orgánica más lábiles aumentan su rotación de C durante el pastoreo (Derner y Schuman, 2007; Piñeiro *et al.*, 2010), lo cual posiblemente determinará las respuestas ocurridas en la EMH. Siendo de esta manera la influencia del pastoreo en el C del suelo en los ecosistemas de pastizales compleja y difícil de predecir al estar sujeta al tipo de suelo y a las condiciones climáticas de cada ambiente (Sankaran y Augustine, 2004).

El C-BM es una de las fracciones lábiles y activas de la materia orgánica presente en el suelo y tiene un dinamismo dado por la estacionalidad del clima que se acompaña del crecimiento de las plantas, lo que fue sugerido por las interacciones entre las áreas ecológicas y las estaciones o las cargas ganaderas y las estaciones. Los datos mostraron diferencias en el C-BM entre la temporada de otoño ( $409 \mu\text{g C g}^{-1}$  del suelo) y la estación de primavera ( $505 \mu\text{g C g}^{-1}$  del suelo) y no hubo diferencias entre las restantes estaciones del año. La estacionalidad del C-BM es difícil de predecir, los valores más altos se producen en diferentes estaciones del año dependiendo de cada ecosistema y su entorno (Wardle, 1998), dado por los recursos (por ejemplo, carbono lábil, agua y nutrientes), condiciones ambientales (temperatura y humedad del suelo)

y se suma la competencia por recursos con las especies vegetales (Bardgett y Leemans, 1996; Lipson *et al.*, 2000; Piao *et al.*, 2000; Bardgett *et al.*, 2002). Estos antecedentes sugieren que en entornos específicos, existe competencia por los recursos disponibles en el suelo para el crecimiento de plantas o microorganismos. Creemos que los valores más altos obtenidos para el C-BM en primavera en los sitios de la Patagonia Sur al comienzo de la temporada de crecimiento fueron dados por la menor competencia con las plantas que todavía no demandan tantos recursos, coincidiendo con el mayor contenido de humedad del suelo y el comienzo de la primavera que se acompaña con aumentos de la temperatura. Jaeger *et al.* (1999) sugirieron que en los ecosistemas de montaña, los microorganismos son más efectivos cuando la competencia de las plantas ha cesado, determinando que los microorganismos del suelo pueden estar "saturados de nutrientes" antes de que haya una cantidad disponible para las plantas (Jonasson *et al.*, 1999; Harte y Kinzig, 1993). Además, para nuestros ambientes, podríamos pensar en una mayor actividad de la raíz al comienzo de la temporada de crecimiento y una mayor exudación de carbono soluble a la rizosfera son pulsos de carbono en el ambiente de la rizosfera que estimularía el crecimiento microbiano (Jaeger *et al.*, 1999; Hertenberger *et al.*, 2002; Liebisch *et al.*, 2014).

#### **2.4. 2. Abundancia de hongos y bacterias**

Los datos de este estudio muestran que la abundancia de bacterias y hongos en los suelos evaluados responde de manera diferente en cada tipo de suelo y ecosistema (Fig. 2.4), esto también fue observado en estudios anteriores (Lauber *et al.*, 2008; Rousk *et al.*, 2010; Egan *et al.*, 2018). Teniendo para nuestros datos que la abundancia de bacterias totales en los suelos en las distintas áreas ecológicas presentó valores similares. De igual modo, Girvan *et al.* (2003) no encontró diferencia en el número de bacterias totales en suelos debido a la igualdad de texturas que tenían los suelos, esto podría compararse en nuestros sitios de muestreo donde todos los suelos tuvieron las mismas texturas arenosas (Tabla 2.4). Buckley y Schmidt (2001) también reportaron que la abundancia de bacterias fue similar en diversos suelos, comunidades vegetales que estaban sujetas a diferentes manejos de uso del suelo. Delgado-Baquerizo *et al.* (2018) estudiando suelos de 237 ubicaciones distribuidas en seis continentes, descubrieron que solo el 2% de los filotipos bacterianos (~ 500 filotipos) representaban casi la mitad de las comunidades bacterianas del suelo en todo el mundo, describiendo que estos taxones dominantes podrían agruparse en

grupos ecológicos de bacterias que comparten preferencias de hábitat, definidos por las condiciones ambientales de cada bioma. De esta manera, consideramos que la cuantificación de las bacterias totales del suelo dentro de las tierras secas de la Patagonia Sur evaluadas, posiblemente muestran una ubicuidad de estas comunidades de microorganismos en los suelos. Brewer *et al.* (2016) plantea que muchos taxones son abundantes en los suelos, pero que existe una similaridad entre distintas muestras de suelo, incluso cuando esas muestras de suelo son de sitios ubicados muy separados. Por otra parte, los resultados muestran que las comunidades de hongos evaluadas a través de la abundancia (Nº de copias de genes) variaron según las áreas ecológicas y años, los hongos totales del suelo en MMN tuvo el menor valor respecto a los suelos de las estepas. Esto podría estar definido por las diferencias en las propiedades químicas del suelo que afectan a las comunidades de microorganismos (Lauber *et al.*, 2008). Egan *et al.* (2018) en suelos de pastizales encontró una relación negativa entre el pH del suelo y los hongos totales (Nº genes 18S rDNA). Del mismo modo, nuestros datos confirman tal correlación (Tabla 2.9), apreciando que en el MMN los valores más altos de pH (Tabla 2.4) se correlacionaron con un menor número de copias de genes de hongos. Otro factor que pudo influir en la abundancia de hongos en las diferentes áreas ecológicas de nuestro estudio es la relación positiva significativa con el contenido de carbono y nitrógeno del suelo. Varios estudios han demostrado tal correlación positiva entra ambas variables confirmando que este patrón es consistente en diferentes escalas espaciales, ecosistemas y tipos de suelo (Lauber *et al.*, 2009; Siles y Margesin, 2016). Otro parámetro químico de suelo que se relacionó con los hongos totales fue la relación inversa con el contenido de fósforo del suelo (Tabla 2.8). El sitio de MMN tuvo el menor valor de Nº de copias de genes de hongos y a su vez presentan los valores más altos de fósforo en el suelo (25 ppm). Esta misma relación ya ha sido informada en otros trabajos (Treseder y Vitousek, 2001; Egan *et al.*, 2018).

Las fluctuaciones anuales de los factores climáticos afectan la dinámica de la biomasa de los microorganismos del suelo (Courty *et al.*, 2008). Nuestros datos evidenciaron una variación en la abundancia de hongos, bacterias y la relación hongos/bacterias entre los años de muestreo (Tabla 2.2). Esto está de acuerdo con un estudio que sugirió que las comunidades microbianas de hongos y bacterias son altamente cambiantes a variaciones en el régimen hídrico (Maestre *et al.*, 2015). Esto pudo haber ocurrido en nuestro estudio, dado que entre años de muestreos las precipitaciones



medias anuales variaron. Ochoa-Hueso *et al.* (2018) y Maestre *et al.* (2015) han demostrado en un gradiente de precipitación global, que las comunidades microbianas fueron muy vulnerables a las condiciones climáticas a corto plazo. Los eventos de variaciones de la precipitación determinan que las comunidades microbianas se vean condicionadas por los aportes de materia orgánica asociados con la muerte de raíces finas y restos vegetales (Schwinning y Sala, 2004).

Evidenciamos la existencia de una correlación positiva entre la abundancia de hongos y bacterias totales del suelo y el C-BM para los suelos de los ecosistemas de Patagonia Sur (Tabla 2.8), coincidiendo con lo informado por Spohn *et al.* (2016). La abundancia de hongos fue más sensible a condiciones de menor humedad ocurrida durante el primer año de muestreo (2016) en comparación a la abundancia de bacterias. Mundra *et al.* (2015, 2016), han demostrado que la abundancia y composición de hongos en ecosistemas árticos varía en escalas temporales anuales debidos a cambios estacionales en las condiciones ambientales que repercuten en las comunidades vegetales y a su vez en los microorganismos. En forma similar, Ochoa-Hueso *et al.* (2018) plantean que la respuesta a las variaciones de humedad en el suelo no modifica la abundancia de bacterias pero si a los hongos, dado por la presencia de una mayor cantidad de taxones de bacterias resistentes a la sequía como *Actinobacteria* y *Chloroflexi*. De esta manera, futuras investigaciones podrían abordar cómo los cambios en la abundancia de los grupos de hongos y bacterias más específicos en una taxonomía inferior (phylum, familia, genero) podrían ser afectados en los suelos de Patagonia Sur, dado que las poblaciones totales de bacterias o hongos parecería que se mantienen relativamente estables en el suelo, y que una discriminación de estas microorganismos en sus grupos funcionales relacionados a los ciclos de los nutrientes podrían brindar información importante para estos ecosistemas (Leff *et al.*, 2015).

La condición de carga ganadera ovina de largo plazo en los ambientes de Patagonia Sur no modificó a las comunidades de bacterias y hongos totales del suelo, así como la relación hongo/bacterias en nuestro estudio. Lo mismo fue reportado por Egan *et al.* (2018) donde determinaron que el pastoreo no afectó el número de copias de genes de hongos y bacterias en suelos de pastizales y tampoco alteró la relación hongo/bacterias. Patra *et al.* (2005) y Ford *et al.* (2013) no encontraron diferencias en la abundancia de hongos y bacterias para suelos de pastizales que estaban sometidos a contrastes de cargas ganaderas. Contrariamente, Grayston *et al.* (2001) y McCaig

*et al.* (1999) encontraron cambios significativos en la estructura de las comunidades bacterianas en pastizales pastoreados con una mayor presión de pastoreo de corto plazo, determinando pulsos de aportes de heces y orina al suelo que favorecieron a las comunidades de bacterias. Sin embargo, nuestros sitios tienen un tipo de pastoreo extensivo y continuo por lo que esos efectos se verían minimizados. En nuestro estudio, las comunidades microbianas de hongos y bacterias totales fueron afectadas por el tipo de comunidad vegetal más que por el pastoreo de los animales, también demostrado por Ford *et al.* (2013) en pastizales de suelos arenosos, donde el tipo de pastizal tuvo mayor preponderancia que la condición de tratamiento de las cargas animales.

La relación hongos/bacterias varió entre las áreas ecológicas; y se encuentran entre los rangos reportados en trabajos anteriores para los diferentes bosques, pastizales y suelos agrícolas (Lauber *et al.*, 2008). En parte, esto estaría dado por la relación inversa observada entre el pH del suelo y la relación hongos / bacterias en nuestro estudio (Tabla 2.9), que coincide con lo informado por Egan *et al.* (2018) en suelos de pastizales. Especialmente, la variación de esta relación está dada por disminuciones en la abundancia de hongos principalmente, junto con aumentos o poca variación en las poblaciones bacterianas (Kennedy *et al.*, 2005; De Vries *et al.*, 2006; Weber *et al.*, 2013), que coincide con lo encontrado para los sitios de estudio de la Patagonia Sur.

#### **2.4. 3. Respiración biológica del suelo (RBS)**

La respiración potencial del suelo mostró diferencias entre las áreas ecológicas evaluadas bajo el gradiente de clima y vegetación. También se ha informado que la respiración *in situ* del suelo evaluada en diferentes áreas ecológicas de la Patagonia Austral variaron significativamente (Peri *et al.*, 2015). Las diferencias encontradas en nuestros resultados tienen a los suelos del MMN (arbustos perennes y leñosos) con un valor de respiración potencial más bajo en comparación con los suelos de la EMH (plantas herbáceas) con un valor más alto. Considerando que las contribuciones de los restos orgánicos podrían ser potencialmente diferentes dependiendo de las especies vegetales que componen las comunidades de plantas en las áreas ecológicas (Zeng *et al.*, 2014; Xu *et al.*, 2015). La RBS muestra una correlación positiva con el contenido de carbono orgánico del suelo, esto también ha sido informado por otros autores (Menyailo *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2013). La cobertura del suelo en nuestro estudio muestra diferencias entre las áreas ecológicas con una

tendencia  $EMH > EMS > MNT$ , que se relaciona con la cantidad de materia orgánica del suelo que se respira como  $CO_2$  (Zhao *et al.*, 2016). Los valores más altos de carbono orgánico podrían explicar las diferencias encontradas en la RBS del área ecológica EMH en comparación con las otras áreas ecológicas (Tabla 2.4). A escala global, las tasas de respiración del suelo se correlacionan positivamente con la temperatura media anual del aire y la precipitación media anual (Raich y Schlesinger, 1992; Wang *et al.*, 2016). Esto también se ha demostrado en nuestros resultados, donde RBS presentó una correlación positiva con la temperatura media anual y la precipitación en los suelos de la Patagonia austral (Tabla 2.9). Dado que la humedad y la temperatura del suelo se controlaron durante la incubación en el laboratorio, la diferencia en las tasas de respiración se debió principalmente a los cambios en la biomasa microbiana y la cantidad y disponibilidad de sustrato que están definidas por las condiciones climáticas y la productividad primaria de los sitios (Zheng *et al.*, 2009). Principalmente, la respuesta al aumento de la RBS en nuestro estudio se asoció con aumentos en el carbono orgánico del suelo y el carbono de la biomasa microbiana del suelo determinados en las áreas ecológicas, lo que se confirmó por la relación positiva obtenida entre el C-BM y RBS (Fig. 2.8 C). Esto se ha evidenciado en varios estudios previos para diferentes tipos de suelo (Wei *et al.*, 2014; Zhao *et al.*, 2017), donde el crecimiento de la biomasa de los microorganismos está asociada a un aumento de la respiración heterotrófica del suelo en los ecosistemas (Tucker *et al.*, 2013).

Las cargas ganaderas del manejo del pastoreo (moderada vs alta) no tuvo efecto en la RBS, aunque si apreciamos una leve tendencia a mayor RBS con manejo de carga moderada (Tabla 2.8). Coincidiendo con nuestros datos, Kieft (1994) informó que el pastoreo no modificó la respiración de suelo en biomas de matorrales y pastizales. En este sentido, la respuesta de la RBS al pastoreo está sujeta en un efecto combinado dada por la interacción con los factores del suelo en los ecosistemas (Zou *et al.*, 2007). Esto se corroboró en nuestro estudio con la interacción entre las áreas ecológicas y las cargas ganaderas sobre la RBS, donde en la EMS la carga alta disminuyó la respiración del suelo y el efecto inverso ocurrió en EMH y MMN. Esta respuesta podría estar dada por las respuestas ocurridas con el C-BM en las interacciones entre las áreas ecológicas y las cargas (Fig. 2.3 B) y además respaldadas por las relaciones encontradas entre ambas variables (Fig. 2.8). Zhao *et al.* (2017) demostraron que las respuestas de la RBS al pastoreo se correlacionaron positivamente con el tamaño de la comunidad microbiana (C-BM) en suelos con intensidades de pastoreos moderadas

y altas. Peri *et al.* (2015) encontraron que en pastizales de Patagonia Sur la tasa de respiración *in situ* del suelo fue 30 % mayor en el pastoreo moderado comparado con el manejo del pastoreo de carga alta, atribuidos por la cobertura de la vegetación y parámetros de suelo como el carbono orgánico. Nuestros datos no reflejan que el pastoreo afecte a la RBS, dado que la respiración evaluada en nuestros resultados contemplan la respiración heterotrófica del suelo. Las diferencias con los datos reportados para los sitios de Patagonia Sur, podrían explicarse por el mayor efecto que ejerce el pastoreo sobre la respiración del suelo al afectar más a la respiración de las raíces de las plantas, que hace referencia a la respiración autotrófica del suelo. Estos resultados de alguna manera respaldan la idea que el pastoreo tienen efectos diferenciales sobre los componentes autotróficos y heterotróficos de la RBS (Zhao *et al.*, 2017).

#### **2.4. 4 Coeficientes ecofisiológicos microbianos**

A escala global, se ha demostrado que  $qCO_2$  difiere entre ecosistemas, con variaciones notables entre biomas, cultivos y ecosistemas naturales, donde las variaciones se asociaron estrechamente con factores biológicos (como las comunidades de microorganismos y plantas), seguidos de los parámetros del suelo y del clima. (Xu *et al.*, 2017). De manera similar, en este estudio, se observa una respuesta diferencial del  $qCO_2$  entre las áreas ecológicas, demostrándose una correlación positiva entre RBS y el  $qCO_2$  de los suelos estudiados (Tabla 2.9). Los valores del  $qCO_2$  tienden a aumentar debido al estrés causado por limitaciones de nutrientes, sustratos de baja calidad que se traduce en una disminución de la eficiencia de los microorganismos, factores que parecen estar influyendo en el área ecológica MMN si observamos las características del suelo (Tabla 2.4). Además, la existencia de una correlación positiva entre RBS y  $qCO_2$  podría atribuirse a los sustratos proporcionados por las plantas que varían en calidad (Spehn *et al.*, 2000), lo que indica que las plantas pueden incidir indirectamente en el  $qCO_2$  al influir en la biomasa microbiana y la respiración del suelo como se mencionó anteriormente en los efectos en estas variables. Esto coincide con nuestros datos de cobertura del suelo, donde los valores de  $qCO_2$  acompañaron el gradiente  $EMH > EMS$  y MMN. Parecería que en el extremo del gradiente, los microorganismos del suelo descomponen más materia orgánica recalcitrante para obtener nutrientes y energía (Craine *et al.*, 2007), lo que

conduce a un aumento de la respiración microbiana, pero esto no se traduce necesariamente en aumentos en el C-BM, y en consecuencia aumenta  $qCO_2$ .

Los valores de  $qM$  en nuestros resultados variaron entre áreas ecológicas y con las cargas ganaderas ovinas de largo plazo de 1,75 a 2,50 %. Sparling (1992) informó que  $qM$  representa entre el 1 y el 4% del carbono orgánico del suelo comparando diferentes tipos de suelo, vegetación e historial de uso del suelo, describiendo que las diferencias en los valores de  $qM$  pueden deberse a la eficiencia de conversión de la materia orgánica en C-BM. Encontramos una respuesta inversa entre el carbono orgánico del suelo de las áreas ecológicas y  $qM$ , donde las áreas ecológicas con mayores valores de carbono orgánico (Tabla 2.4) tuvieron los valores más bajos de  $qM$  (Fig. 2.7 B). Además, el  $qM$  disminuyó con un manejo de carga alta de pastoreo en comparación con la carga moderada. De manera similar, Holt (1997) encontró que  $qM$  disminuyó con el pastoreo de carga alta en pastizales semiáridos, a su vez, Li *et al.* (2013) han observado que la  $qM$  disminuyó en los pastizales que estaban sujetos a diferentes grados de degradación por el pastoreo en suelos templados fríos. Las correlaciones obtenidas para los suelos de la Patagonia Austral muestran la existencia de interdependencia entre el crecimiento y el mantenimiento de la biomasa microbiana e indican que un cociente metabólico bajo corresponde a un  $qM$  alto, es decir: una mayor asimilación de C orgánico en la biomasa microbiana y la formación de materia orgánica del suelo (Anderson y Domsch, 1990). Esto indica que las alteraciones por las cargas contrastantes (moderada vs alta) generadas por el pastoreo en la vegetación (principalmente aumentando la proporción de C recalcitrante que ingresa al suelo debido a cambios en la comunidad de plantas), indirectamente, parecen tener un impacto en los microorganismos del suelo.

#### **2.4. 5. Los micrositios del arbusto *Mulguraea tridens* y las variables microbiológicas**

El suelo debajo del canopeo de los arbustos de Mata Negra (*Mulguraea tridens*) tuvo respuesta diferente y significativa sobre el C-BM y la RBS en comparación con los sitios del interparche. En parte, esto estaría dado por niveles más altos de recursos, como agua, materia orgánica y nutrientes en el suelo del canopeo dado por el efecto de 'isla de fertilidad' (Garner y Steinberger, 1989; Gonzalez-Polo y Austin, 2009). Esto también ha sido respaldado por otros estudios de suelos bajo el canopeo de arbustos de *Artemisia tridentata* (Bolton *et al.*, 1993), *Hammada scoparia* y *Zygophyllum*

*dumosum* (Xie y Steinberger, 2001) y matorrales de *Atriplex canescens* (Kieft, 1994). En nuestros sitios, el suelo debajo del canopy del arbusto tuvo valores superiores de N total, P y K en relación a los suelos del interparche, lo cual coincide con varios estudios que confirman el efecto positivo de las “islas de fertilidad” debajo del canopy de los arbustos en ambientes áridos y semiáridos que favorecen al crecimiento y la actividad de los microorganismos (Bolton *et al.* 1993, Kieft, 1994; Sun *et al.*, 2017). Las diferencias observadas en C-BM y RBS en los micrositios del matorral de MMN estarían dadas por condiciones favorables microclimáticas (humedad del suelo), cantidad y calidad de restos de material vegetal aportados por los arbustos y exudados de las raíces en el ambiente rizósferico (Bolton *et al.* 1993; Brodie *et al.*, 2002). Prieto *et al.* (2011) encontraron los valores más altos de C-BM del suelo debajo del canopy de *Larrea divaricata* y *Chuquiraga erinacea* que se atribuyeron a los efectos directos de las plantas sobre las condiciones abióticas y bióticas (sustrato más lábil rico en C). También, nuestros resultados determinaron una relación positiva entre el C-BM y la RBS en los suelos del matorral de mata negra (*M. tridens*). De igual manera, esta relación ha sido corroborada por otros estudios, donde la actividad medida a través de la RBS y el crecimiento de los microorganismos estimado en su biomasa presentaron tal relación positiva para suelos de diferentes biomas de vegetación (Treseder, 2008; Wei *et al.*, 2014; Riggs y Hobbie, 2016).

El efecto del micrositio sobre las variables  $qCO_2$  y  $qM$  no fueron observadas de manera significativa en este estudio, lo cual contrasta con los resultados obtenidos por Kieft (1994) donde el  $qCO_2$  fue más bajo y el  $qM$  fue más alto en el suelo debajo del canopy del arbusto *Atriplex canescens* en relación a los suelos del interparche. Esto estarían dados por la características de suelo, concretamente ellos presentaron diferencias entre el carbono orgánico de los micrositios (canopy-interparche), sin embargo nuestros datos de carbono orgánico del suelo en los micrositios mostraron valores similares. Según Ayarbe y Kieft (2000) ellos no encontraron diferencias en el  $qM$  en micrositios de arbustos, lo cual es coincidente con nuestros datos, atribuidos a la variabilidad estacional que presenta el  $qM$  en el suelo. Goberna *et al.* (2007) encontraron que los microorganismos debajo del canopy de los arbustos eran menos eficientes por presentar mayor  $qCO_2$ , atribuidos a que debajo del dosel de los arbustos los microorganismos del suelo están sometidos a interacciones y competencias con las plantas que crecen debajo del canopy alterando la eficiencia metabólica. Condición esta, que podría explicar la falta de diferencias significativas en nuestros

resultados para esta variable de  $qCO_2$ , debido al porte de la planta en su arquitectura de las ramas basales del arbusto *Mulguraea tridens* (ver Fig. 2 E y F) que no permite el crecimiento de otras especies de plantas debajo de su dosel y en consecuencia no estarían sometidos a esa competencia con las plantas por los recursos (Bertiller *et al.*, 2004, Billoni *et al.*, 2016).

Las “islas de fertilidad” en nuestros sitios de estudio presentaron similares abundancias totales de hongos y bacterias en los suelos. Carrera y Bertiller (2010) han indicado que las raíces finas y superficiales de los arbustos perennes podrían colonizar el suelo de los espacios del interparche en la profundidad de 0 – 15 cm, existiendo además un crecimiento superficial de las raíces de las plantas herbáceas y subarbustos en un mismo volumen de suelo para estos ecosistemas dada por la adaptación ecológica de las plantas para el uso del agua (Ferrante *et al.*, 2014). De esta manera, los micrositios podrían estar compartiendo las mismas comunidades de microorganismos que crecen asociados e interactúan con las raíces de las plantas del ambiente rizosférico. A pesar de ello, esto contrasta con Zhou *et al.* (2017) donde si observaron diferencias entre micrositios respecto a las comunidades de hongos y bacterias. Esas diferencias podrían deberse a la presencia de sustratos recalcitrantes, los cuales aumentarían las comunidades fúngicas debido a la alta eficiencia con la que los hongos usan heteropolímeros de plantas (Chigineva *et al.* 2009). Además, está referenciado que las comunidades fúngicas del suelo son influenciadas por la calidad del sustrato, relación C/N (Allison *et al.*, 2007; Lauber *et al.*, 2008). Esto se respalda en nuestros resultados al observar la relación C/N, la cual da una aproximación de la calidad del sustrato orgánico de los micrositios, los cuales fueron similares, explicando que la abundancia de las comunidades fúngicas en los micrositios del canopeo e interparche del arbusto *M. tridens* podrían deberse por la igualdad de la relación C/N, carbono orgánico del suelo factores que son importantes en las respuestas a nivel de comunidades microbianas del suelo.

## **2.5. CONCLUSIÓN**

Estos resultados informan los primeros resultados de los parámetros microbiológicos del suelo en las principales áreas ecológicas del sur de la Patagonia Argentina. El gradiente ambiental de las áreas ecológicas mostró una correlación positiva en la biomasa microbiana, las comunidades fúngicas, la RBS y el coeficiente metabólico microbiano, que se atribuye a la cantidad de C orgánico en el suelo, lo que confirma la importancia de este recurso para los microorganismos del suelo. Las altas cargas ganaderas disminuyeron el C-BM suelo y el qM, esta disminución podría tener implicaciones para la acumulación de C en el suelo dada la relevancia de la biomasa microbiana para la formación de carbono estable en los suelos. La dinámica estacional e interanual en el C-BM y en las comunidades de bacterias y hongos, se atribuyeron a la precipitación y su relación con un mayor crecimiento y actividad en plantas que proporcionan mejoras en el microbioma del suelo. El canopeo de los arbustos de *M. tridens* determinó aumentos en N, P, K, C-BM y RBS como una respuesta positiva a las condiciones de microhabitat.



## **Capítulo 3**

# **HONGOS FORMADORES DE MICORRIZAS ARBUSCULARES ASOCIADAS A PLANTAS EN ÁREAS ECOLÓGICAS DE LA PATAGONIA SUR QUE CONTRASTAN CARGAS GANADERAS OVINAS**

### 3. 1 INTRODUCCIÓN

Es conocido que los hongos MA, las plantas hospedadoras y el suelo forman complejas interacciones entre sí (Martínez y Pugnaire, 2009) y con su ambiente. En general, se estima que el 90% de todas las plantas vasculares están micorizadas y alrededor del 80% forman micorrizas arbusculares (MA) (Smith y Read, 1997, 2008). Las micorrizas favorecen la supervivencia de las plantas en los ecosistemas, determinan una mejora en la nutrición de las plantas, contribuyen en la formación del suelo y en sus propiedades físico-químicas; así mismo incrementan la tolerancia a distintos tipos de estrés, tanto bióticos como abióticos (Francis y Read, 1995; Zobel *et al.*, 1997; Brundrett, 2004; Smith y Read, 2008). Las asociaciones entre las plantas y las micorrizas son de naturaleza compleja, y su interacción forma, cuando pertenecen al mismo tipo de simbiosis, redes de hifas fúngicas interconectadas entre sí y que conectan los sistemas radicales de distintas plantas (inclusive taxones y formas de vida distintos) que contribuyen a regular el flujo de nutrientes y las interacciones competitivas inter e intraespecíficas de las plantas en los ecosistemas. Esta profusa red de hifas influye en aspectos de la ecología a nivel de los ecosistemas sobre la coexistencia de la comunidad vegetal (Tedersoo *et al.*, 2020).

La provincia de Santa Cruz (46° a 52°S) se caracteriza como una región árida-semiárida, donde la estructura de la comunidad vegetal varía según el gradiente de precipitación (Jobbágy *et al.*, 1995), el tipo de suelo y la variación topográfica (Soriano y Sala, 1983; Bisigato y Bertiller, 2004). Los ecosistemas áridos de la Patagonia Austral están representados en un 85% por plantas propias de la estepa arbustiva y se caracterizan principalmente por la presencia de coirones (*Festuca spp.*, *Stipa spp.*), pastos cortos (*Poa spp.*, *Carex spp.*), subarbustos (*Nardophyllum spp.*, *Empetrum spp.*) y arbustos (*Berberis spp.*, *Mulguraea spp.*) (Peri *et al.*, 2013).

Actualmente, existe un continuo avance en reportes de especies de plantas que se registran como plantas hospedadoras de MA que están documentadas para toda América del Sur (Pagano y Lugo, 2019). En este contexto, hay trabajos que han estudiado a la simbiosis micorrícicas en los ambientes de la Patagonia que van de los bosques a las zonas esteparias (Barroetaveña *et al.*, 2005; Fernández *et al.*, 2010, 2012; Diehl y Fontenla, 2010; Velázquez *et al.*, 2016; Dudinszky *et al.*, 2019). En las comunidades de estepa, en el Noroeste Patagónico (Provincia Fitogeográfica Patagónica) Fontenla *et al.* (2001) documentaron la presencia de MA en 97 especies nativas, dentro de las cuales se encuentran gramíneas del estrato herbáceo de valor

forrajero (e.g. *Poa lanuginosa*, *Poa ligularis*) y especies de arbustos y subarbustos (e.g. *Berberis aff. buxifolia*, *Adesmia boronioides*, *Acaena* sp.). Sin embargo, existen pocos antecedentes sobre micorrizas en las especies representativas de ecosistemas de Patagonia Austral a pesar de los importantes beneficios estudiados que estos hongos generan en las especies de plantas y a nivel del ecosistema suelo.

Las diferentes condiciones ambientales (precipitaciones y/o temperaturas) impactan sobre las plantas, y por ende en los pastizales y en los microorganismos que están asociados a las plantas como los que forman las simbiosis MA (Miller *et al.*, 2012). Algunos trabajos han informado que las condiciones de humedad del suelo afectan directamente a los hongos MA o indirectamente al afectar el desarrollo de las raíces de las plantas (Deepika y Kothamasi, 2015; Li *et al.*, 2015; Martínez-García *et al.* 2015). La baja humedad del suelo también limita la disponibilidad de nutrientes del suelo que son asimilados por las plantas (particularmente P, N y K) y consecuentemente el efectos sobre el crecimiento de las plantas, el desarrollo de las raíces y la colonización de los hongos MA (Nouri *et al.*, 2014). Las propiedades físico-químicas son consideradas como moderadores potenciales de la variación de las comunidades de hongos MA, al afectar en forma positiva o negativa a la simbiosis micorrícica en los ecosistema (Tuomi *et al.*, 2001; Mohammad *et al.*, 2003; Hoeksema *et al.*, 2010).

En ocasiones, se suma factores externos relacionados al clima y a factores antrópicos, que conllevan alteraciones sobre las interacciones y en particular sobre la simbiosis micorrícica. Uno de estos factores es el pastoreo del ganado en los pastizales naturales que afecta las funciones del ecosistema a nivel de las plantas y de los hongos micorrícicos arbusculares (Eldridge *et al.*, 2016; Jiang *et al.*, 2017; Fan *et al.*, 2019). La ganadería extensiva es una de las principales actividades de la región Patagónica, con 2.700.000 cabezas (SENASA, 2017), donde las cargas animales varían desde 0,13 a 0,75 cabezas ha<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup> según las áreas ecológicas y la intensidad de uso a la que es sometida cada una de ellas. De esta manera, las cargas ganaderas de ovinos en estos ambientes podrían modular la simbiosis micorrícica como se ha informado en distintos estudios. Los hongos, por ser heterótrofos, utilizan los fotosintatos de la planta (Bethlenfalvay *et al.*, 1985) como fuente de energía y de carbono, tanto dentro de la raíz cuando establecen la simbiosis micorrícica o al utilizar los exudados de las raíces en el suelo. Autores como Smith y Read (2008) señalan que la función de las simbiosis es dependiente del carbono fijado por la planta.

El impacto del pastoreo de ganado sobre las MA ha diferido en los diversos tipos de pastizales en el mundo (Barto y Rillig, 2010; van der Heyde *et al.*, 2017; Yang *et al.*, 2020). Mientras algunos estudios han demostrado una disminución de la colonización de MA tras el pastoreo en praderas de *Bromus* sp., *Poa* sp., *Stipa* sp., *Agropyron* sp., *Artemisia* sp. y otras gramíneas en los ecosistemas de pastizales semiáridos de Nevada y Mongolia (Bethlenfalvay y Dakessian, 1984; Bethlenfalvay *et al.*, 1985; Ren *et al.*, 2018). Otros, han citado que la simbiosis MA aumentó con el pastoreo en los pastizales de suelos de Finlandia y Estados Unidos (Eom *et al.*, 2001; Hokka *et al.*, 2004; Kula *et al.*, 2005). Otros casos no detectaron diferencias en la colonización de *Bouteloua gracilis* a diferentes intensidades de pastoreo en la estepa semiárida de México (Medina-Roldan *et al.*, 2008). Esta diversidad de resultados, por un lado se debe a que el pastoreo de ganado afecta en forma diferencial la estructura y función de los ecosistemas de pastizales a través de la defoliación del pisoteo de las plantas, la compactación del suelo y la deposición de heces y orina de los animales (Mikola *et al.*, 2009). Por ejemplo, la disminución de la superficie foliar por pastoreo reducen la capacidad de suministro de hidratos de carbono a las raíces (Bethlenfalvay y Dakessian, 1984), y dependiendo de esta magnitud podría afectar de manera negativa a los hongos MA. Otros estudios demostraron que la asignación de carbono a las raíces a menudo aumenta después de la defoliación, al incrementar el carbono en los exudados al medio rizosférico (Waters y Borowicz, 1994; Mikola *et al.*, 2001). Gehring y Whitham (2002) encontraron al estudiar más de 35 especies de plantas que la herbivoría afecta a la colonización de las micorrizas dependiendo de las formas de vida de las especies vegetales (anuales, bianuales o perennes; herbáceas o leñosas); las diferentes estrategias de crecimiento les permite responder de manera diferente a la pérdida de tejido reasignando recursos a los puntos de crecimiento (Hawkes y Sullivan, 2001). A su vez, los hidratos de carbono en las raíces y los exudados de las especies vegetales que se liberan al ambiente rizósferico podrían influir sobre los hongos micorrícicos, microorganismos endófitos y rizósfericos asociados (Mikola *et al.*, 2001).

En este contexto, el objetivo del presente capítulo fue describir la simbiosis MA en diferentes áreas ecológicas de la Patagonia Austral y analizar el efecto del pastoreo. Para ello, se estudió la colonización de hongos MA en plantas dominantes de estos ecosistemas, que presentaban manejos de pastoreo contratantes entre sí.

Las hipótesis planteadas respecto a la colonización de los hongos MA fueron: I) La colonización de los hongos MA en las áreas ecológicas de la Patagonia Austral tendrán una correlación positiva con las mejores condiciones bióticas y abióticas del sitio; II) La simbiosis de hongos MA en las plantas presentará una relación negativa con cargas ganaderas altas de largo plazo; y III) Las respuestas de la colonización de MA respecto de la carga ganadera y los ambientes dependerá de las formas de vida de la especie vegetal estudiadas: la colonización MA de los subarbustos y arbustos no se afectarán por la carga ganadera, y por el contrario las especies herbáceas (gramíneas) disminuirán la colonización MA en sus raíces con las mayores cargas ganaderas dependiendo del sitio.

### **3. 2. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3. 2. 1. Sitios de estudio**

El trabajo se realizó en la provincia de Santa Cruz (Patagonia Austral), en tres sitios correspondientes a las áreas ecológicas de Matorral de Mata Negra (MMN), Estepa Magallánica Seca (EMS) y Estepa Magallánica Húmeda (EMH) bajo dos cargas ganaderas contrastantes de largo plazo (ver Fig. 2.1, 2.2; Capítulo 2). En el Capítulo 2 de la sección 2.2 se encuentran detalladas las principales características climáticas (Tabla 2.2), cobertura del suelo y tipo de vegetación (Tabla 2.3). Las cargas ganaderas de largo plazo de los sitios evaluados varían de 0,15 a 1,20 (EO ha<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup>) según el área ecológica, para más detalles (ver Tabla 2.1; Capítulo 2).

#### **3. 2. 2. Muestreo de plantas**

Con el objetivo de evaluar la presencia, tipo y porcentaje de colonización de MA, se realizó un muestreo durante la primavera (noviembre- diciembre) durante dos años (2016 y 2017). El muestreo contempló las tres áreas ecológicas (EMH, MMN y EMS), cada uno con dos manejos de carga ganadera del pastoreo ovino (moderada y alta). En cada sitio y dentro de cada una de las parcelas de 1000 m<sup>2</sup> (n=3) se realizó una transecta de 50 m de largo por 1 m de ancho, donde se recolectaron aquellas plantas representativas y dominantes de cada una de las áreas ecológicas y con una cobertura >10 % (Tabla 3. 1). Las distintas especies seleccionadas tienen importancia por la preferencia para el consumo de los animales (Borrelli y Oliva, 2001; Manero *et al.*, 2006; Andrade *et al.*, 2015). En cada una de las transectas/sitio se seleccionaron al azar hasta cuatro especies de plantas, y de las distintas formas de vida (herbáceas,

subarbustos y arbustos), y se recolectaron 9 individuos de cada especie de planta por sitio. Esto determinó un total de ~400 plantas (3 áreas ecológicas x 2 intensidades de uso x 2 años de muestreos x 3-4 especies que tienen forma de vida distintas x 9 plantas por especie). Las plantas de tamaño similar pequeño se extrajeron cuidadosamente con la ayuda de una pala y piquetas, y luego se colocaron en bolsas de plástico rotuladas para almacenarlas a 4 °C hasta su procesamiento en laboratorio, en el caso de subarbustos o arbustos se seleccionaron los sistemas radicales claramente unidos al individuo. Las raíces de todas las plantas muestreadas (antes de las 48 hs) se cortaron y separaron de la parte aérea de la planta, y se enjuagaron cuidadosamente con agua corriente para limpiar y eliminar restos de suelo y otras partes vegetales o sistemas radicales de otros individuos. Finalmente, las raíces de cada individuo fueron conservadas en alcohol al 70% en cantidad suficiente como para llenar un recipiente con un volumen de aproximadamente 50 mL hasta la tinción.

**Tabla 3.1.** Clasificación y distribución de las plantas dominantes y de preferencia para el consumo por parte de los ovinos que se utilizaron para estudiar la simbiosis MA en las áreas ecológicas de la Patagonia Austral Argentina.

Familia	Especie *	Forma de vida	Ubicación	Preferencia forrajera en la dieta **
Poaceae	<i>Poa duseii</i> Hack.	Perenne gramínea	MMN EMS EMH	~12 %
Poaceae	<i>Rytidosperma virescens</i> (E. Desv.) Nicora var. <i>virescens</i>	Perenne gramínea	EMS EMH	~8 %
Cyperaceae	<i>Carex argentina</i> Barros	Perenne ciperácea	MMN EMS	~7 %
Asteraceae	<i>Nardophyllum bryoides</i> (Lam.) Cabrera	Subarbusto	MMN	~5 %
Verbenaceae	<i>Mulguraea tridens</i> (Lag.) N. O'Leary & P. Peralta	Perenne	EMS MMN	~3 %
Poaceae	<i>Festuca gracillima</i> var. <i>Glacialis</i>	Perenne gramínea	MMN EMS EMH	~2 %

\* Clasificación Anton *et al.* (2012) \*\* Porcentaje de las especies de plantas en la dieta de los ovinos tomado de Manero *et al.* (2006).

### 3. 2. 3. Tinción y cuantificación de MA

Para la cuantificación de la colonización de micorrizas arbusculares, se utilizaron raíces finas (<2 mm) pertenecientes a cada una de las plantas recolectadas en el campo. Todas las muestras de raíces se tiñeron usando el método modificado de Phillips y Hayman (1970), siguiendo las etapas: (i) Decoloración: las raíces se sumergieron primero en una solución de 10 % (P/V) de K(OH) a 98 ° C durante 1 –

1,5 h dependiendo de la especie vegetal. (ii) Clarificación: en esta etapa las raíces fueron tratadas con una solución al 5 % (V/V) de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30 V) y 0,5 % de NH<sub>3</sub> durante 5-30 minutos, donde el tiempo de exposición a la solución fue mayor en las raíces más oscuras. (iii) Acidificación y tinción: esta última parte consistió en colocar las muestras de raíces en un medio ácido 1 % V/V de HCl durante 5 minutos y luego fueron tratadas con el colorante Tripán Blue en glicerol ácido (31 % V/V de glicerol, 31 % V/V de ácido láctico y 0,05 % P/V de Tripán Blue) calentándolo a 98° C por 15 minutos. (iv) Almacenamiento: Finalmente, las raíces teñidas se conservaron en glicerol ácido hasta su observación al microscopio. Las raíces fueron examinadas bajo microscopio óptico (Olympus BX40), la ocurrencia y el porcentaje de la raíz colonizada por hongos MA se cuantificó con el método descrito por McGonigle *et al.* (1990), llamado de intersecciones ampliadas, al observar al microscopio bajo aumento (20X). Para ello, se seleccionaron al azar 10 raíces de cada muestra de aproximadamente 1 cm de longitud, se montaron paralelas en un portaobjetos. En total se cuantificó tres réplicas de laboratorio (n=3, se montaron tres preparados y ~30 cm de raíces) por cada muestra individual (individuo/especie/sitio/área/año), teniendo cada muestra tres preparados (30 raíces = ~30 cm) que fueron examinados en la cuantificación de más de 300 campos de observación al microscopio por muestra. Las estructuras características de MA (hifas intracelulares o intercelulares, vesículas, rulos (coils) y arbuscúlos (Smith y Read, 2008) fueron utilizadas para determinar campos positivos de colonización de MA. El criterio de confirmación utilizado en este estudio para determinar la ocurrencia de las MA fue la presencia de al menos un arbuscúlos por muestra. Las estructuras típicas de micorrizas u otros hongos asociados a la raíz se documentaron tomando imágenes con una cámara digital (Sony ExwaveHAD) e Image-Pro Plus 4.1.0.0. software de análisis para Windows.

### **3. 2. 4. Características de suelo**

Los parámetros físico-químicos del suelo que se utilizan en el presente capítulo fueron analizados en Capítulo 2 y son: pH, densidad aparente (Da), carbono orgánico del suelo, los nutrientes entre ellos en nitrógeno (N), fósforo (P) y potasio (K). Los datos varían según las áreas ecológicas, con rangos de pH entre 5 y 6 dependiendo de los sitios, las texturas de los suelos son predominantemente arenosa y franco arenosa, y con valores de carbono orgánico de suelo entre 1,27 y 3,83 % para MMN y EMH, respectivamente, ver Tabla 2.4; Capítulo 2).

### 3. 2. 5. Análisis estadístico

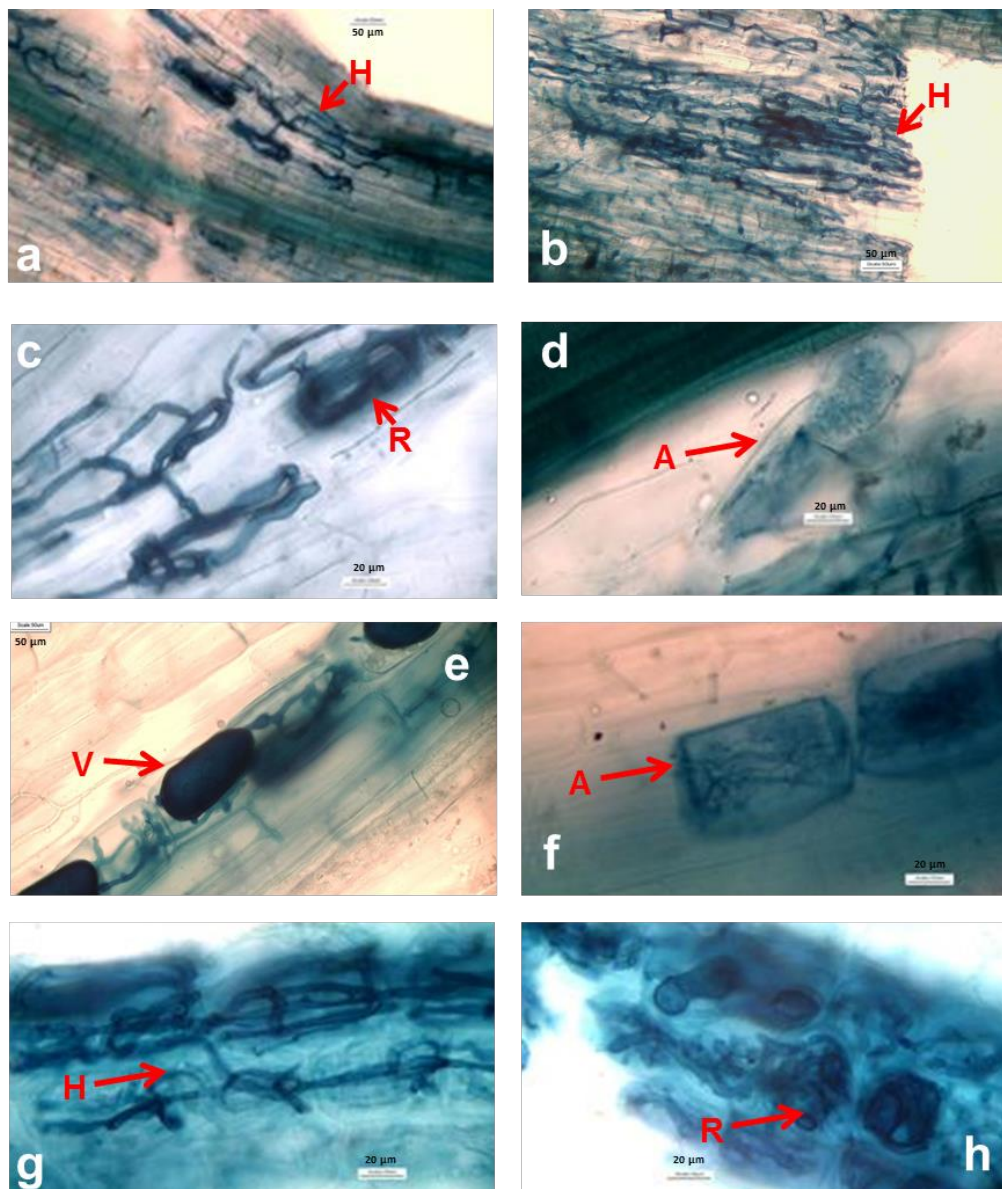
Los datos fueron analizados utilizando el software INFOSTAT (Di Rienzo *et al.*, 2013). Los valores de colonización con MA fueron analizados mediante pruebas no paramétricas de Kruskal-Wallis, debido a que no cumplían con los supuestos de normalidad y homocedasticidad. Las diferencias significativas entre las medias fueron analizadas con el test de Tukey con un nivel de significancia de  $p < 0,05$ . Los análisis del comportamiento micorrícica se realizaron según las siguientes jerarquías de análisis: i. Patagonia Austral, ii. Área ecológica, y iii. Especie de planta. Para evaluar en la Patagonia Austral (en su generalidad) el efecto del pastoreo, los años de muestreo y las áreas ecológicas sobre la variable colonización MA se usaron todas las plantas hospedadoras de MA muestreadas, analizándose los tres factores: el factor 1: área ecológica, con tres niveles (MMN, EMS y EMH); el factor 2: año de muestreo con dos niveles (2016 y 2017); y el factor 3: carga ganadera, con dos niveles (moderadas y altas). Los resultados de la especie no hospedadora *Carex argentina* no fueron incluidos. En las áreas ecológicas el efecto del pastoreo sobre la variable colonización MA se analizó respecto del factor carga ganadera, con sus dos niveles (moderada y alta) considerando las plantas muestreadas en cada área ecológica en los dos años. Se analizó el comportamiento de cada especie de planta en su respectiva área ecológica sobre la variable colonización MA considerando el factor carga ganadera con sus dos niveles (moderada y alta). Las especies de plantas analizadas fueron *Poa duseii*, *Rytidosperma virescens*, *Festuca gracillima*, *Nardophyllum bryoides* y *Mulguraea tridens*. No se analizó *Carex argentina* por ser no hospedadora. Las relaciones entre las áreas ecológicas (MMN, EMS y EMH), las características físicas y químicas del suelo (pH, Da, carbono orgánico, N, P, y K), precipitación media anual de los sitios (ppt) y la colonización de MA de todas las plantas hospedadoras de MA muestreados en 2016 y 2017 sin discriminar por carga ganadera se evaluaron usando un análisis de componentes principales (ACP). Se determinaron los coeficientes de correlación de Pearson obtenidos de análisis pareados entre la colonización de MA de todas las especies hospedadoras analizadas en todos los sitios y las variables de suelo. Para establecer la relación entre micorrización y nutrientes de suelo se realizaron regresiones lineales simples; la variable dependiente fue la colonización con todas las especies hospedadoras analizadas en todos los sitios y las variables independientes fueron las concentraciones de carbono orgánico, N, P y K del suelo.



### 3. 3. RESULTADOS

#### 3.3.1 Micorrizas arbusculares en los ecosistemas de Patagonia Austral

La mayoría de las especies de plantas estudiadas (*Poa duseii*, *Rytidosperma virescens*, *Festuca gracillima*, *Nardophyllum brioides* y *Mulguraea tridens*) fueron hospedadoras de hongos MA, a excepción de *Carex argentina*. En las raíces de estas especies, se pudo observar las diferentes estructuras fúngicas características de la colonización por MA, como las hifas intracelulares, vesículas, rulos (coils) y arbuscúlos (Fig. 3.1).



**Fig 3.1.** Diferentes estructuras microscópicas intraradicales de los hongos MA en las plantas hospedadoras de las áreas ecológicas de la Patagonia Austral Argentina. *Mulguraea tridens* (a, b), *Poa duseii* (c), *Nardophyllum bryoides* (d, e), *Rytidosperma virescens* (f, g) y *Festuca gracillima* (h). Se identifican con flechas las estructuras de los hongos MA como: (H) hifas intraradicales, (R) rulos-coils, (V) vesículas y (A) arbuscúlos, con escalas de 50 µm (a, b, e) y de 20 µm (c, d, f, g, h).

La colonización de MA de las plantas evaluadas en este trabajo para los ecosistemas de la Patagonia Austral presentaron una media general del ~30 % en las raíces de las especies de plantas que predominan en estos ambientes. Los resultados analizados en general determinaron que hubo diferencias significativas en la colonización de hongos MA entre las distintas áreas ecológicas ( $p=0,0023$ ), con un gradiente creciente EMS>MMN>EMH, siendo la EMS significativamente diferente de la EMH. Los resultados de la colonización de MA cuando se analizan los años de muestreos (2016 - 2017) en un análisis global para todos los sitios, no mostraron diferencias significativas; igual resultado arrojó cuando se consideró las cargas ganaderas ovinas (moderadas y altas) (Tabla 3.2).

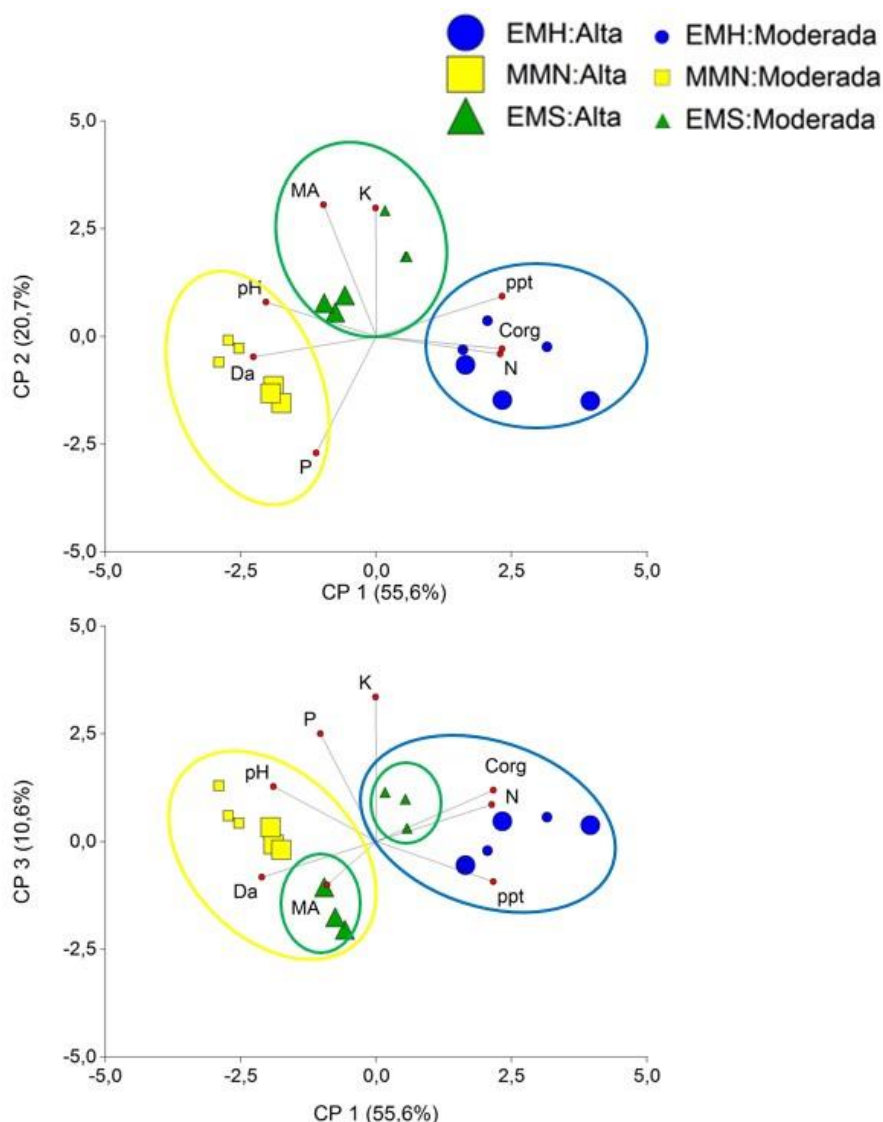
**Tabla 3.2. Micorrizas** arbusculares (MA) evaluados por año según las áreas ecológicas y carga ganadera ovinas contrastantes de largo plazo (>50 años) en ecosistemas de la Patagonia Austral analizados con Kruskal-Wallis, letras diferentes entre áreas ecológicas indican significancia estadística con  $p < 0,05$ .

Factores de estudio	Nº individuos y especies <sup>(**)</sup>	Colonización MA (%)	H	p-Valor
<b>Áreas ecológicas<sup>(*)</sup></b>			12,18	<b>0,0023</b>
MMN	126 (Pd,Fg,Nb,Mt,Ca)	27,6 ( $\pm 17,9$ ) ab		
EMS	144 (Pd,Rb,Fg,Nb,Ca)	32,5 ( $\pm 19,7$ ) b		
EMH	108 (Pd,Rb,Fg)	23,8 ( $\pm 15,3$ ) a		
<b>Años</b>			1,05	0,3047
2016	180 (Pd,Fg,Rb,Nb,Mt,Ca)	29,3 ( $\pm 17,9$ )		
2017	198 (Pd,Fg,Rb,Nb,Mt)	27,6 ( $\pm 18,6$ )		
<b>Cargas ganaderas</b>			3,35	0,0671
Moderada	189 (Pd,Fg,Rb,Nb,Mt)	29,8 ( $\pm 17,8$ )		
Alta	189 (Pd,Fg,Rb,Nb,Mt)	27,1 ( $\pm 18,7$ )		

(\*) Áreas ecológicas= MMN: Matorral de mata negra, EMS: Estepa magallánica seca y EMH: Estepa magallánica húmeda; (\*\*) Especies de plantas= Mt: *Mulguraea tridens*, Pd: *Poa duseinii*, Nb: *Nardophyllum bryoides*, Rb: *Rytidosperma virescens*, Fg: *Festuca gracillima* y Ca: *Carex argentina*.

Los resultados del análisis de componentes principales se observan en la Fig. 3.2, en los tres primeros ejes se explicaron el 86,9 % de la varianza total de las muestras (55,6%, 20,7% y 10,6% para los CP1, CP2 y CP3, respectivamente). En el análisis de los ejes 1 y 2 del ACP se observa una separación de dos de las áreas ecológicas, que se comportan en forma opuesta. El área MMN es explicada por valores superiores de Da y pH, y opuestos a los de la EMH que a su vez esta explicado por valores altos de N, C org y ppt (Fig. 3.2. A). Respecto de la colonización MA, sólo el área EMS en tres muestras (correspondientes a los sitios de carga moderada) están relacionadas con valores altos de MA y de K. Las otras áreas ecológicas se comportan como independientes de estas últimas variables que fueron MA, K y P (Fig. 3.2. A y B). En

los ejes 1 y 3, el comportamiento es similar al mostrado en los ejes anteriores, observándose que el pH, la Da del suelo y en menor medida la colonización de hongos MA se comportan de forma similar y opuesta al N, C orgánico del suelo y ppt para separar y agrupar a las áreas ecológicas (Fig. 3. 2. B).



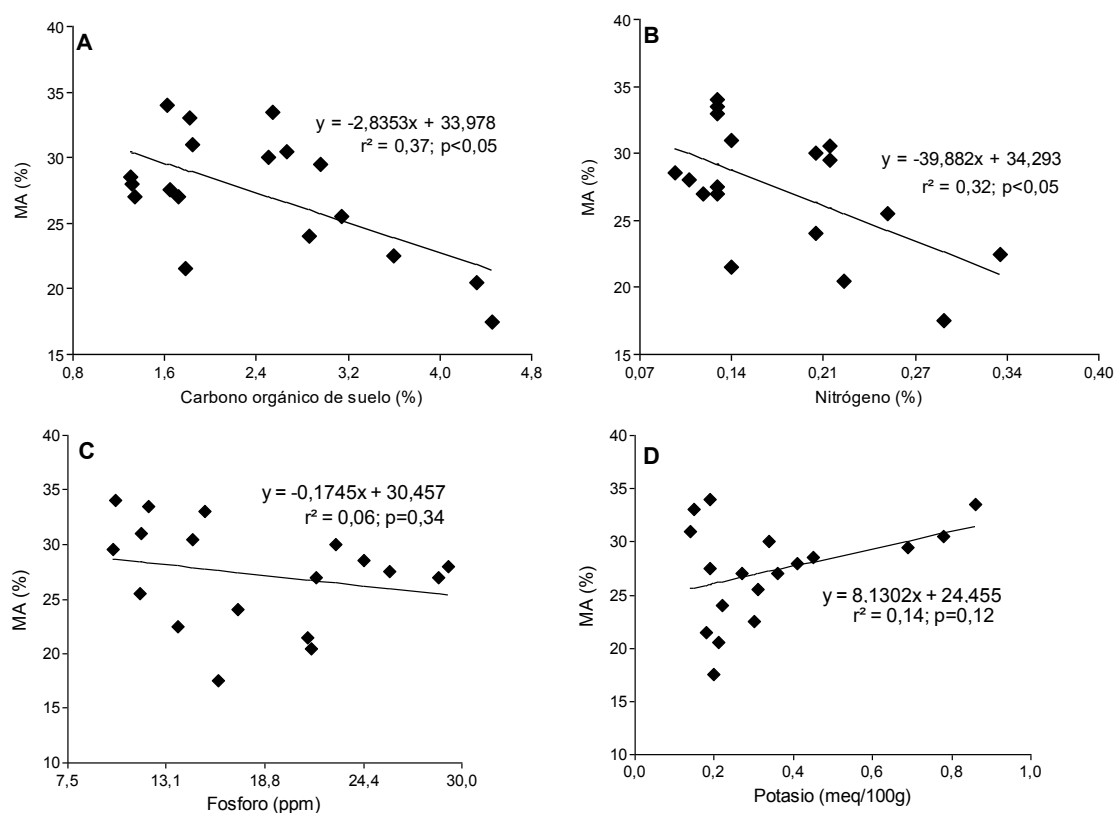
**Fig. 3. 2.** Análisis de componentes principales de las micorrizas arbusculares, precipitaciones medias anuales y las características físico-químicas del suelo para las áreas ecológicas (■ MMN: Matorral de mata negra, ▲ EMS: Estepa magallánica seca y ● EMH: Estepa magallánica húmeda) de la Patagonia Austral utilizando todas las plantas hospedadoras de MA muestreadas en 2016 y 2017 discriminando los sitios de carga moderada (símbolos pequeños) y alta (símbolos grandes).

### 3.3.2 Relaciones entre la colonización MA y las variables de suelo

Los resultados del coeficiente de correlación de Pearson mostraron una correlación negativa y significativa entre la colonización de hongos MA y el carbono orgánico ( $r = -0,60$ ;  $p = <0,05$ ) y el N ( $r = -0,58$ ;  $p = <0,05$ ) del suelo. En contraste, el pH ( $r = 0,57$ ;

$p = <0,05$ ) y la densidad aparente ( $r = 0,45$ ;  $p = <0,06$ ) tuvieron una correlación positiva. Para el P ( $r = -0,24$ ;  $p = 0,34$ ) y el K ( $r = 0,38$ ;  $p = 0,12$ ) del suelo no se observó correlaciones significativas.

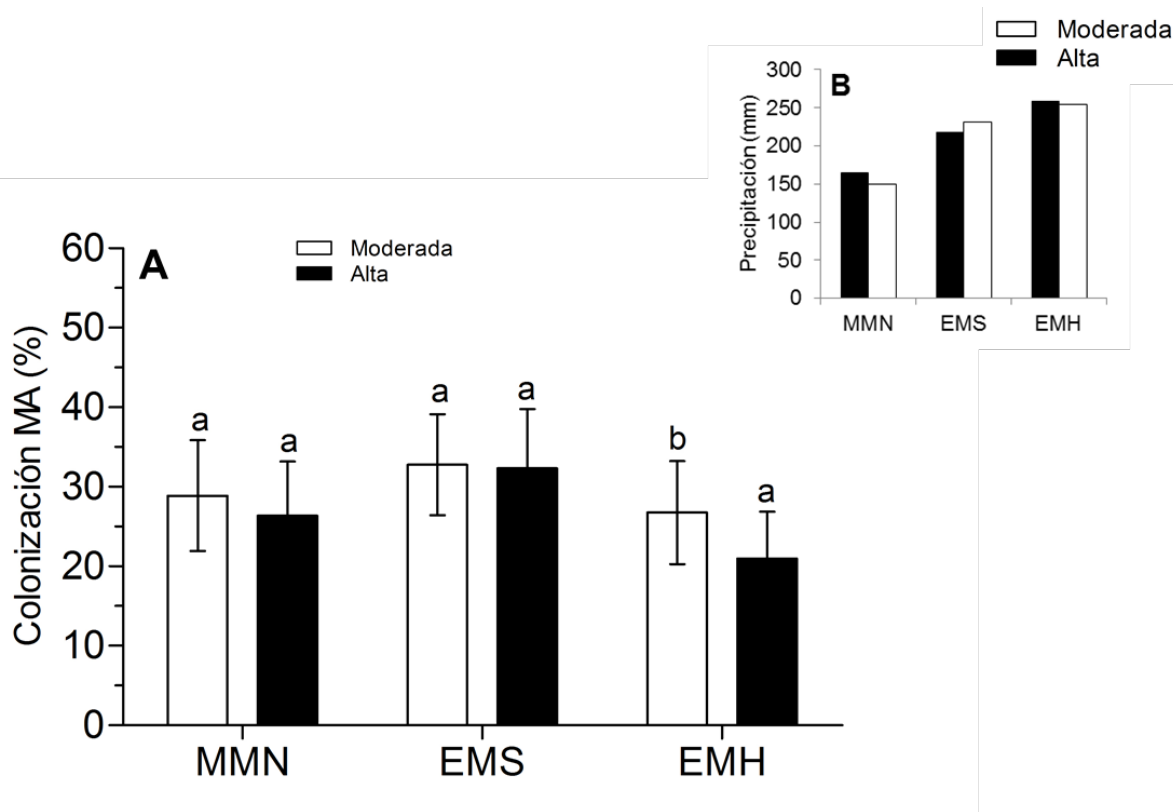
Los datos del análisis de regresión lineales simples para la colonización de hongos MA del conjunto de las especies de plantas hospedadoras evaluadas en los suelos de Patagonia Austral tuvieron una relación lineal negativa con el carbono y N del suelo que explicaron el 37 y 32 %, respectivamente de la variabilidad observada ( $p < 0,05$ ). Por otro lado, el P y el K del suelo explicaron en menor medida la respuesta de la colonización de MA (Fig. 3.3).



**Fig. 3.3.** Relación del carbono orgánico, nitrógeno, fosforo y potasio del suelo con la colonización de hongos MA en suelos de los pastizales de la Patagonia Austral.

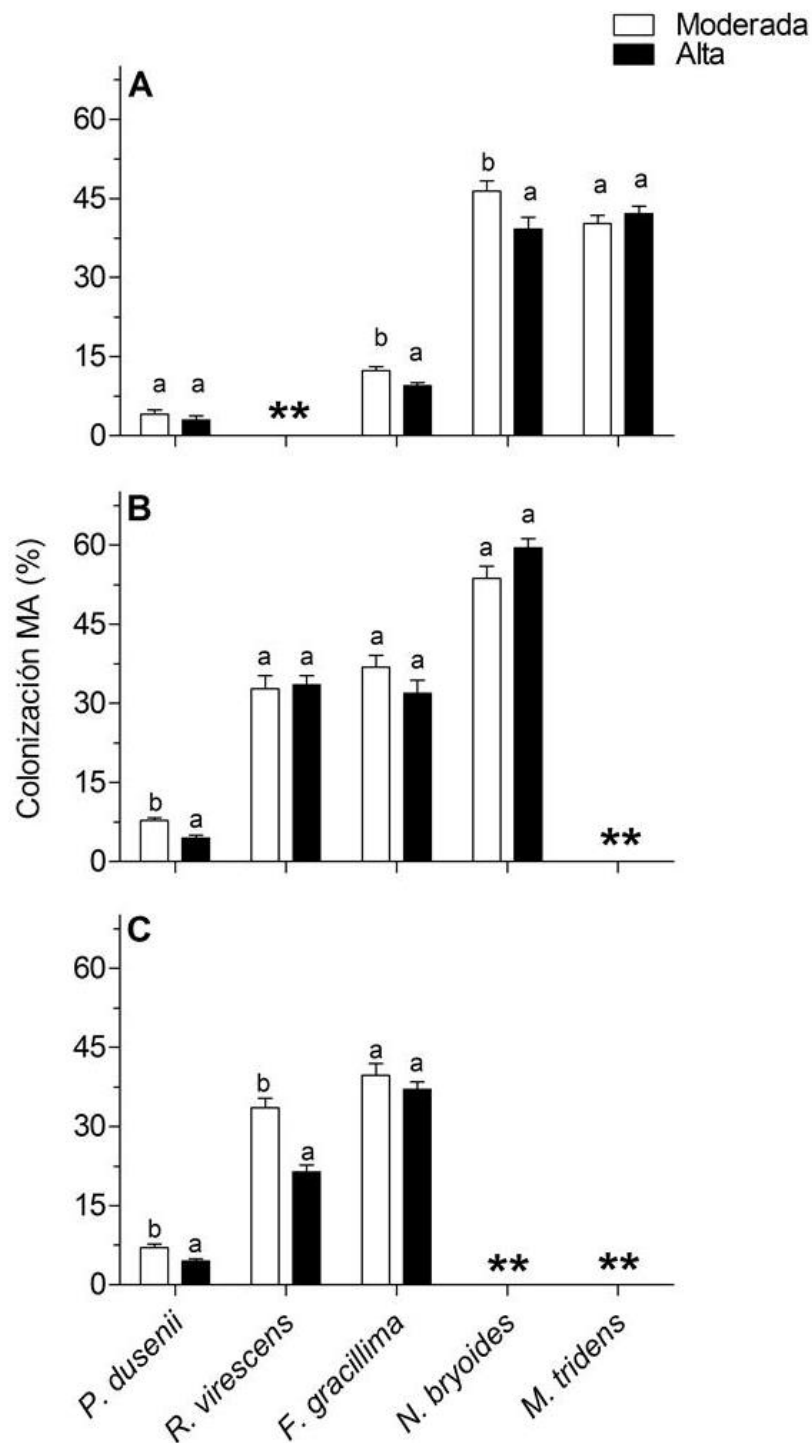
### 3.3.3 Las MA y los efectos del pastoreo a nivel de las áreas ecológicas y sobre las especies de plantas

Cuando se analizó cada una de las áreas ecológicas respecto del efecto de las cargas ganaderas (moderada vs alta) se observa que en la estepa magallánica húmeda (EMH) existe una diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) entre los sitios con cargas de pastoreo distintos: la colonización disminuyó en los sitios con carga ganadera alta, respecto de los valores de la carga moderada (Fig.3. 4).



**Fig.3.4.** Influencia del manejo de pastoreo de carga ganadera ovina (moderada vs alta) en cada una de las áreas ecológicas de la Patagonia Austral. A: Colonización de hongos MA de todas las especies dominantes de cada área ecológica estudiada. Se muestran los valores medios y desvíos. Letras minúsculas distintas indican significancia estadística ( $p < 0,05$ ) en cada área ecológica por el factor carga ganadera. B: Distribución de la precipitación media anual histórica en cada área ecológica respecto de la carga ganadera ovina de largo plazo. MMN: Matorral de mata negra, EMS: Estepa magallánica seca y EMH: Estepa magallánica húmeda.

Cuando analizamos el comportamiento micorrícico por especie de planta dentro de cada una de las áreas ecológicas que se estudió, se observa una tendencia de aumentar la colonización micorrícica según la forma de vida: gramíneas < subarbustos < arbustos. En general se observó que algunas especies de plantas dentro de cada área ecológica presentaron valores de MA significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) según la carga ganadera (Fig. 3.5).- En cada área ecológica las siguientes especies de plantas disminuyeron la colonización de hongos MA en los sitios con un manejo de carga ganadera alta en comparación con la carga moderada: en el MMN las especies *F. gracillima* y *N. brioides* (Fig. 3.5.A); en la EMS la especie *P. dusenii* (Fig. 3.5.B) y en la EMH las especies de *P. dusenii* y *R. virescens* (Fig. 3.5.C).



**Fig. 3.5.** Colonización de hongos MA en las especies de plantas representativas de cada una de las áreas ecológicas (A) MMN: Matorral de mata negra, (B) EMS: Estepa magallánica seca y (C) EMH: Estepa magallánica húmeda de la Patagonia Austral con cargas ganaderas contrastantes (moderada vs alta). Se muestran los valores medios de MA y los desvíos estándar. Letras minúsculas distintas indican diferencia significativas ( $p < 0,05$ ) para cada especie de planta en cada áreas ecológicas. \*\* Plantas no presentes en el sitio.

### 3. 4. DISCUSIÓN

#### 3. 4. 1. Micorrizas en los ecosistemas de Patagonia Austral

Las micorrizas son una asociación simbiótica cosmopolita que se han encontrado en todos los ecosistemas del mundo, en donde los hongos MA están presentes en las raíces de aproximadamente el 80% de las plantas terrestres (Smith y Read, 2008). Los hongos micorrícicos arbusculares están relacionados con la dinámica de las comunidades de plantas y las funciones del ecosistema (Rillig, 2004). Pagano y Lugo (2019) mencionan que los hongos micorrícicos arbusculares están identificados en más de 2300 taxones de plantas para toda América del Sur. En la región Patagónica Argentina varios autores han informado la presencia de MA en las especies de plantas de los ecosistemas que abarcan ambientes desde los bosques Andino-Patagónicos a las estepas (Barroetaveña *et al.*, 2005; Diehl y Fontenla, 2010; Fernández *et al.*, 2010; García *et al.*, 2012; Velázquez *et al.*, 2016; Cavagnaro *et al.*, 2017,2019; Dudinszky *et al.*, 2019). Fontenla *et al.* (2001) estudió 158 especies de plantas de la región del Noroeste de la Patagonia, y citó un 71,6 % de especies hospedadoras y 27,4 % de especies no-hospedadoras de micorrizas, describiendo que el 72 % de las plantas herbáceas y 84 % de los sub-arbustos y arbustos estudiados presentaban MA. Entre los taxones estudiados en el trabajo antes mencionado se encuentran las familias estudiadas en esta tesis: Asteraceae, Verbenaceae, Cyperaceae y Poaceae. En la familia Poaceae estos autores encontraron especies hospedadoras (y/o facultativas) de MA (*Festuca pallescens*, *Poa lanuginosa*, *Poa ligularis*, *Rytidosperma virescens*) y especies no hospedadoras (*Hordeum comosum*, *Poa Holciformis*, *Stipa chrysophylla*), como también mencionaron especies de las familias típicamente NO hospedadoras como es el caso de *Carex spp.*, *Eleocharis spp.*, *Schoenus spp.* de la familia Cyperaceae (Fontenla *et al.*, 2001).

En este contexto, los datos de esta tesis evidencian que la mayoría de las especies de plantas nativas dominantes y preferidas por el ganado de la Patagonia Austral (*Poa dusenii*, *Rytidosperma virescens*, *Festuca gracillima*, *Nardophillum bryoides*, *Mulguraea tridens*), son hospedadoras de MA, con excepción de *Carex argentina* que se comportó como una especie no hospedadora. La falta de colonización de MA en raíces de *C. argentina* ha sido informado en otros trabajos donde el género *Carex* y la familia Cyperaceae se describen en general como no micorrícico (Tester *et al.*, 1987), o en unos pocos casos como facultativa (Smith y Read, 1997; Miller *et al.*, 1999; Fontenla *et al.*, 2001).

Los hongos MA tienen importancia para las plantas en los ecosistemas áridos-semiáridos al ser esenciales en la recuperación de las comunidades vegetales sometidas a distintos tipos de estrés ambiental como la deficiencia de nutrientes y la sequía, al permitir el mantenimiento de la estructura y funcionalidad de las comunidades de plantas (Barea *et al.*, 2011). En general, la colonización de MA propia de un ambiente, toma un amplio rango de valores debido a que están integrados por comunidades multiespecies, donde el status de colonización está definido por la interacción entre los simbioses (Tedersoo *et al.*, 2020). A su vez la simbiosis MA tienen cierta especificidad que varía entre las formas de vidas de las especies vegetales, según lo han informado Hoeksema *et al.* (2010) y Davison *et al.* (2020), donde las especies herbáceas tienen una baja especificidad y las especies leñosas una mayor especificidad a la simbiosis. En nuestros ecosistemas que integran a varias especies y de formas de vida distintas los diversos rangos de colonización encontrados entre las especies estudiadas podrían acompañar por la especificidad de la simbiosis. Gibson-Roy *et al.* (2014) informaron que en los ambientes áridos de Australia 12 especies nativas tuvieron valores entre 11 – 49 % de colonización MA, según la especie y el sitio. También, se ha informado que en ecosistemas del mediterráneo con 358 mm de precipitación anual y estudiando 5 especies de sub-arbustos representativos para estos ecosistemas la colonización MA tuvo un rango relativamente alto y constante (50% a 66%), sugiriendo una alta dependencia por la simbiosis micorrícica de las plantas (Sánchez-Castro *et al.*, 2012). Los resultados del presente estudio muestran una colonización de MA para los pastizales áridos de Patagonia Austral de aproximadamente un valor medio para las plantas analizadas del 30 % de colonización de hongos MA, con valores que fluctuaron entre 5 a 65 % dependiendo de la especie, por ejemplo 5 % la especie *Poa duseii*, 26 % *Festuca gracillima*, 30 % *Rytidosperma virescens*, 41 % *Mulguraea tridens* y 49 % *Nardophillum bryoides*, y el área ecológica. Asimismo, en ambientes parecidos a los del presente estudio se describió que la colonización de MA en especies dominantes de la estepa Patagónica varió entre 10 y 70 % según las especies hospedadora, al considerar las especies *Bromus pictus* (65 %), *Poa ligularis* (5 %), *Pappostipa speciosa* (17 %) y *Pappostipa humilis* (5 %) (Cavagnaro *et al.*, 2017). Los rangos en los valores de colonización MA dependen de diversos factores, entre ellos las comunidades de plantas y los hongos del suelo (entre ellos los hongos MA) y las características del ambiente (Rillig, 2004). Las plantas a través de sus características propias genéticas



y fenotípicas (Parniske, 2004; Harrison, 2005) definen los porcentajes de micorrización máxima dependiente también de los costos energéticos de la simbiosis. Otro factor a considerar es la interacción entre el tipo de suelo y las especies de planta hospedantes (Johnson *et al.*, 2004; del Mar Alguacil *et al.*, 2016). La interacción de las raíces con el suelo (*bulk soil*) y la rizosfera influyen en la morfología y arquitectura de las raíces, donde ocurre la colonización por hongos formadores de micorrizas arbusculares (Brundrett, 2002). Reyes y Aguiar (2017) sostienen que a pesar que en la estepa Patagonia existe una vegetación de baja cobertura (<50 %), integrada por multiespecies (hierbas perennes y sub-arbustos y arbustos) los sistemas de raíces de las distintas especies coexisten en el mismo volumen de suelo lo cual permitiría la interacción entre las raíces vecinas de la comunidad de especies que integran el ecosistema, existiendo además un crecimiento superficial de las raíces de las especies de plantas de estos ecosistema, debido a la adaptación que le permite tener un mayor aprovechamiento de agua de lluvia (Ferrante *et al.*, 2014). Actualmente, es conocido que el conjunto de hifas forman una red interconecta entre las raíces de las misma planta, y entre raíces de plantas vecinas (de igual o distinto taxón o forma de vida) que favorece los flujos de agua y nutrientes entre ellas y mejora la aptitud de las propiedades del suelo en el ambiente (Arias *et al.*, 2008). De esta manera, podríamos considerar que para estos ecosistemas áridos-semiáridos de la Patagonia Austral con condiciones adversas (periodos de sequía, temperaturas extremas, fuertes vientos, con una mayor evapotranspiración, suelos con baja disponibilidad de agua y de nutrientes) los hongos MA son un factor clave para la implantación y el desarrollo de las plantas. Comparado con a otros ecosistemas donde la limitación por recursos no restringen el crecimiento, las plantas de los ambientes semiáridos y áridos podrían ser más dependientes de la colonización de MA (Arias *et al.*, 2008; Barea *et al.*, 2011). La presencia de hongos MA en las especies de plantas sugieren la dependencia de las plantas a la colonización de MA en los ambientes esteparios de Patagonia, esta hipótesis ha sido confirmada en otros estudios para ambientes similares que resaltan la importancia de los hongos MA en los ecosistemas (Martínez y Pugnaire, 2009; Barea *et al.*, 2011).

Existe una complejidad de factores que pueden contribuir con los valores de la colonización de MA de las plantas hospedadoras a escalas espaciales de paisaje (heterogeneidad espacial en la simbiosis). Los resultados de esta tesis muestran que la colonización de MA de las plantas en la Patagonia Austral (Sur) varía dependiendo

del área ecológica. Por un lado la respuesta a la colonización MA es intrínseca a las comunidades de plantas de cada área ecológica (Mendoza *et al.*, 2002). Por otro, la simbiosis MA está ampliamente distribuida en todos los ambientes, y los hongos micorrícicos arbusculares son en general relativamente poco específicos respecto a las plantas que hospedan, y en consecuencia colonizan la mayoría de los taxones de plantas (Smith y Read, 2008). Sin embargo, en algunos taxones existe un cierto grado de preferencia y muestran niveles variables de especificidad del hongo huésped por diferentes especies de plantas (Vandenkoornhuyse *et al.*, 2003). En este mismo sentido, Oehl *et al.* (2003) al estudiar los suelos de los pastizales de Europa Central referencian que algunas géneros y especies de hongos se encuentren ampliamente distribuidas (generalistas), mientras que otros hongos MA se limitan a algunas las condiciones ambientales (específicos). La distribución espacial de las plantas individuales sobre el suelo podría conducir a una estructura espacial a pequeña escala de las comunidades micorrícicas del suelo (Wolfe *et al.*, 2009). Un estudio experimental ha demostrado que la composición de la comunidad vegetal puede afectar la composición de las comunidades de micorrizas en una escala de 1 m<sup>2</sup> (Burrows y Pfleger, 2002). Este aspecto, que considera las variaciones espaciales de las comunidades de plantas, podría explicar en parte, las variaciones en la colonización MA que se observaron en nuestras áreas ecológicas.

Como se mencionó previamente, está bien estudiado que la colonización de MA tiene un patrón característico de menor colonización de hongos micorrícicos en plantas herbáceas y una mayor colonización en las especies de sub-arbustos y arbustos (Smith y Read, 2008). En forma similar, en las áreas ecológicas evaluadas en el presente estudio, se observa que en la EMH hubo un predominio de especies de gramíneas (*P. dusenii*, *R. virescens* y *F. gracillima*) con los menores valores de colonización de MA. En cambio, en los sitios donde la comunidad de especies vegetales estuvo integrada también por sub-arbustos y arbustos dominantes (*N. bryoides*, *M. tridens*) como ocurre en las áreas ecológicas de la EMS y MMN, con mayor grado de colonización de MA. La distribución de las formas de vida con valores de colonización MA diferentes (gramíneas<sub-arbustos-arbusto) podría explicar también las variación del comportamiento micorrícico a nivel del paisaje.

Es posible suponer que los hongos micorrícicos se desarrollan a partir de redes de hifas de hongos MA (Giovannetti *et al.* 2004) y además se dispersan por medio de las partículas del suelo y agua (Harner *et al.*, 2011), el viento (Egan *et al.*, 2014) y/o los

animales (Lekberg *et al.*, 2011); estos presentan una dispersión eficiente a larga distancias (Davison *et al.*, 2018). Todos estos aspectos influyen en el establecimiento diferencial de las distintas comunidades de hongos MA y de las comunidades de plantas hospedadoras. Lekberg *et al.* (2007) en un estudio de la variación de las MA que fueron estudiadas en 10 campos ubicados a una distancia de 1 a 25 km entre sí, concluyeron que, si bien las características del suelo explican algunas de las variaciones regionales de los hongos MA en los diferentes campos, la distancia entre los sitios explicó una porción significativa de la disparidad entre los sitios, potencialmente debido a la dispersión de inóculos infectivos de MA. Todos los aspectos antes citados contribuyen a explicar las diferencias de colonización entre las diferentes áreas ecológicas.

Además de la variación de las comunidades de plantas y hongos, también se ha reportado que otros factores bióticos como abióticos influyen en la simbiosis micorrícica; por ejemplo el suelo y el clima (Mohammad *et al.*, 2003). Hoeksema *et al.* (2010) en un meta-análisis informaron que la respuesta de la simbiosis micorrícica está influenciadas por factores como: I) la identidad de la planta huésped y sus características funcionales, II) identidad y tipo de hongos, III) características físicas y químicas del suelo, IV) interacciones bióticas que ocurren en el suelo que son características propias de cada ambiente. Estos resultados son coincidentes con los obtenidos en esta tesis, demostrados tanto por los estudios de correlaciones como los análisis de componentes principales. El área ecológica EMH caracterizada principalmente por especies de gramíneas, es un ambiente que recibe mayores precipitaciones anuales y presenta en el suelo, un pH ligeramente más ácido y contenidos de carbono orgánico y nitrógeno mayores a los de las otras áreas ecológicas (EMS y MMN). El área EMH tiene mejores condiciones nutrientes en el suelo y disponibilidad de agua (por mayores precipitaciones) para el crecimiento de las plantas. Por el contrario las áreas MMN y la EMS se relacionan con valores menores de estos nutrientes.

Se ha mostrado que los hongos MA, una vez establecida la simbiosis, absorben fosfatos, amonio y nitratos del suelo, además de agua y otros nutrientes y elementos trazas. Algunos de estos hongos MA también pueden, favorecer la utilización de compuestos orgánicos del N, que se asimilan como aminoácidos en las estructuras del micelio y que luego son mineralizados y transferido a las planta (Hodge y Storer, 2015). Tuomi *et al.* (2001) plantearon que una menor colonización de MA ocurre en

aquellos ambientes con mayores cantidades de nutrientes en el suelo. En la estepa patagónica, generalmente el N en el suelo es escaso y está presente en forma poco móvil (Gherardi *et al.*, 2013; Peri *et al.*, 2019). En este contexto, es esperable que la asociación MA podría ser una estrategia beneficiosa para el crecimiento y supervivencia de las plantas en estos ecosistemas.

El análisis de componentes principales se desprende que la colonización de hongos MA de todas las plantas analizadas se relacionan en forma inversa con los contenidos de P del suelo y en forma positiva con el K disponible en el suelo (Fig. 3. 2 A); sin embargo los resultados no fueron significativas cuando se realizaron regresiones lineales simples (Fig. 3.3 C D). Por ejemplo, mientras que en el área ecológica EMS presentó ~12 ppm de P del suelo y en el área MMN el P del suelo fue superior a 25 ppm; ambas áreas tuvieron un mayor grado de colonización de hongos MA en las raíces de las plantas, comparado a la EMH (~15 ppm de P) con una menor colonización de MA. La asociación entre los distintos nutrientes de suelo y los porcentajes de colonización MA son variables. Nouri *et al.* (2014) observaron que la simbiosis de MA se promovió bajo limitación de N independientemente del P del suelo. Blanke *et al.* (2005), encontraron un aumento de la colonización MA bajo limitaciones de N en suelos con alto contenido de P. Por otra parte, Cavagnaro *et al.* (2017) determinaron que en parches de arbustos con mayor disponibilidad fósforo se acompañaron con mayor colonización de MA en los ecosistemas patagónicos, lo cual podría ser coincidente a los resultados obtenidos para nuestro sitio del área ecológica MMN con presencia de un arbusto como *M. tridens*. Esta variabilidad parecería tener consistencia con nuestros resultados, ya que mientras el área ecológica EMS presentó valores bajos de P y medios de N, en la EMH se mostró valores altos de N y medios de P, y por el contrario el área ecológica MMN tuvo valores bajos de N y altos de P. Esto sugiere que las plantas promueven la colonización de la raíz siempre que al menos uno de los nutrientes (N y/o P) sea limitante. A su vez, las diferencias ambientales dada por las precipitaciones en cada una de las áreas ecológicas con un gradiente que va desde la EMH (250 mm) > EMS (230 mm) > MMN (155 mm) (Fig. 3.4. B) podrían llevar a que la baja humedad del suelo limitará la disponibilidad de nutrientes (N o P) y por lo tanto estimular la colonización de los hongos MA en las raíces de las especies plantas (Miller *et al.*, 2012; Nouri *et al.*, 2014). Siendo, la colonización MA de los hongos en las raíces de las plantas una estrategia que determina la coexistencia de ambos simbioses a través de las ventajas que brindan

a las plantas hospedadoras, al facilitar la absorción de nutrientes y permitir la tolerancia al estrés biótico y abiótico (Deveautour *et al.*, 2018; Smith y Smith, 2011).

### **3. 4. 2. Micorrizas y la respuesta al pastoreo**

El pastoreo de ganado afecta fuertemente la estructura y la función del ecosistema de pastizales naturales en todo el mundo (Eldridge *et al.*, 2016). Los efectos del pastoreo sobre la simbiosis de micorrizas presentan respuestas variables, con estudios que reportan que el pastoreo animal disminuye la colonización de hongos MA y otros donde el pastoreo aumenta la colonización (Bethlenfalvay *et al.*, 1985; Hokka *et al.*, 2004; Grigera y Oesterheld, 2004; Kula *et al.*, 2005). Por el contrario, otros estudios describen que el pastoreo no ejerce modificación en la colonización de MA (Lugo *et al.*, 2003; van der Heyde *et al.*, 2017).

En esta tesis, se analizaron los datos a nivel global considerando las tres áreas ecológicas (MMN, EMS y EMH) y las 5 especies y 3 familias estudiadas que incluyen arbustos (*M. tridens* - *Verbenaceae*), sub-arbustos (*N. bryoides* - *Asteraceae*) y gramíneas (*F. gracillima*, *R. virescens* y *P. dusenii* - *Poaceae*). Los resultados determinaron que a nivel global las cargas ganaderas contrastantes, bajo pastoreo continuo de largo plazo, no modificaron la colonización MA en el ecosistema de Patagonia Austral. En este mismo sentido, Barto y Rillig (2010), en su meta-análisis, no encontraron una disminución de la simbiosis micorrícica entre tratamientos de pastoreo, describiendo que la herbivoría redujo la colonización en aproximadamente 3 puntos porcentuales, pero esta disminución fue tan pequeña que no tuvo significancia biológica. Esto es consistente con otros casos reportados en el trabajo de van der Heyde *et al.* (2017) donde la colonización MA no fue afectada por la remoción de biomasa que se ocasionan en las plantas hospederas a causa del pastoreo.

Muchas veces, el efecto del pastoreo sobre la colonización MA están enmascaradas por las interacción con los factores bióticos y abióticos de cada ambiente en particular, y por ende en la potencial relación pastoreo-suelo-planta-hongos MA (Mendoza *et al.*, 2002; Ruotsalainen y Eskelinen, 2011). Por ello, al analizar cada área ecológica en forma independiente, se encontró que el efecto de las cargas ganaderas contrastantes en la colonización de hongos MA dependió del área ecológica en estudio. En la EMH, sitio con mayor precipitación y con dominancia de gramíneas, la colonización de MA disminuyó significativamente con la carga ganadera alta. Sin embargo, en las otras

dos áreas ecológicas, EMS y MMN, no se observó cambio asociados al pastoreo entre las cargas moderas y altas. Los efectos del pastoreo sobre la colonización MA podría deberse a diversos factores, directos sobre los hongos MA o indirectos a través de la planta hospedadora o del ecosistema suelo-raíces (Ruotsalainen y Eskelinen, 2011). Un factor a tener en cuenta es la influencia de los animales al incorporar sus deyecciones (heces y orina) al ecosistema suelo, afectando al suelo y a los hongos MA (Mikola *et al.*, 2009). Por otra parte, otros factores son el daño producido por pisoteo (Lezama y Paruelo, 2016) asociados a la compactación del suelo y al deterioro del sistema vegetal tanto aéreos como subterráneo. En este contexto, Barto y Rillig (2010) han planteado que los tipos de planta hospedadora son moderadores significativos del efecto del pastoreo sobre la simbiosis MA. Cavagnaro *et al.* (2017) informaron que en la estepa del norte de Patagonia la existencia de arbustos permitió que las especies herbáceas tengan una mayor colonización de MA, dado que los arbustos actúan como un refugio contra el pastoreo para las plantas y para la simbiosis micorrízica.

Es posible, en base a este análisis suponer un efecto atenuante de las especies sub-arbustivas y arbustivas sobre la colonización de MA en las áreas EMS y MMN. Además, las especies sub-arbustivas y arbustivas en las áreas EMS y MMN tienen raíces desarrolladas que alcanzan mayores profundidades de exploración en el suelo (Bertiller *et al.*, 2004, 2005), lo que les permite minimizar los efectos negativos del pastoreo respecto al pisoteo. La existencia de redes de hifas interconectadas de los hongos MA entre las raíces de las plantas vecinas que integran la comunidad vegetal del sitio podrían atenuar los impactos del pastoreo sobre la colonización de MA. Según Tedersoo *et al.* (2020) la existencia de redes de hifas por debajo del suelo que permiten movilidad de nutrientes y agua entre individuos de una misma especie, inclusive entre distintas especies y formas de vidas de la comunidad de plantas de los ecosistemas. En los ecosistemas dominados por especies herbáceas, cuyos sistemas radicales más superficiales y parte vegetativa (hojas y macollos) el pastoreo tendría a ejercer un efecto negativo sobre la colonización de hongos MA; mientras que los sub-arbustos y arbustos las respuestas son predominantemente neutrales a la colonización de MA en sus raíces (Díaz *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2020). Otro factor sugerido por Bethlenfalvay y Dakessian (1984) y Bethlenfalvay *et al.* (1985) es que el pastoreo afecta a la simbiosis micorrízica a través de la remoción de biomasa vegetal (que el animal realiza sobre las plantas) afectando la interacción planta-hongo y el

equilibrio energético de la simbiosis, dado que los hongos MA son microorganismos heterótrofos dependiente de los fotosintatos de la planta. También sabemos que el animal ejerce una cierta selectividad sobre las especies más preferidas para su consumo, la cual depende de la intensidad y duración del pastoreo y la frecuencia con la que las plantas son consumidas (Barto y Rillig, 2010; Eldridge *et al.*, 2016). La herbivoría podría afectar los niveles de colonización de los hongos micorrícicos arbusculares al cambiar el patrón de asignación de carbono (por ejemplo, exudados) hacia las raíces y en consecuencia para los hongos (Hetrick *et al.*, 1990; Ren *et al.*, 2018). Hay trabajos que han demostrado que la remoción de biomasa aérea a causa del pastoreo es acompañada con mayores exudados de C que son direccionados a la rizósfera, resultando en mejoras para la interacción raíz-hongo (Hamilton y Frank, 2001; Hamilton *et al.*, 2008).

Barto y Rillig (2010) han planteado que el tipo de planta hospedadora son moderadores significativos en los efectos del pastoreo sobre la simbiosis MA. En la presente tesis cuando se analizó el comportamiento micorrícico para cada especie de planta, el efecto del pastoreo afecta en forma diferencial a cada especie de planta según el área ecológica. *P. dusenii* disminuyó la colonización de MA con las cargas altas, en las áreas EMS y EMH, al igual que *R. virescen* en la EMH. Esto estaría respaldado por la preferencia y selectividad que ejercen las ovejas sobre estas especies de plantas más palatables (Borrelli y Oliva, 2001; Andrade *et al.*, 2015). Esto es coincidente, con otros autores que estudiaron plantas del mismo género (*Poa ligularis*) y mostraron que la colonización de MA en sus raíces fue afectada por la carga ganadera alta dado que esta especie tienen una gran dependencia a la simbiosis MA (Cavagnaro *et al.*, 2019). En el MMN *P. dusenii* presento una tendencia no significativa a las cargas ganaderas, y en cambio las especies *F. gracillima* y *N. bryoides* disminuyeron significativamente la colonización de MA en los sitios con carga alta. Varios autores han estudiado la dinámica de la cobertura vegetal y la densidad de las especies de plantas representativas de la estepa en situaciones de pastoreo contrastantes, las cuales disminuyen dado por la preferencia del ganado (Cipriotti y Aguiar, 2005; Golluscio *et al.*, 2009). Como se mencionó antes, el efecto del pastoreo dependió de la interacción de la especie de planta y el área ecológica estudiada, observándose casos donde los efectos de la carga ganadera no fueron significativos (*R. virescens* y *F. gracillima* en EMS; *F. gracillima* en la EMH; y *P. dusenii* en MMN). Ferraro y Oesterheld (2002) informaron algunos casos en los que una reducción de la

biomasa aérea por pastoreo no es acompañada por una reducción en la biomasa radicular, mencionando una posible atenuación del efecto negativo en la colonización de MA. La persistencia de los meristemas activos en las plantas luego de la defoliación, permite desarrollar nuevos tejidos fotosintéticos y pareciera ser otra alternativa atenuante sobre el pastoreo, que le permite a la planta sostener la demanda de los hongos y mantener la micorrización (Walling y Zabinski, 2006). Otro explicación estarían dadas según lo plantearon Koch *et al.* (2006) es sus estudios para suelos de Suecia donde mostraron que la variación genética y fenotípica en las especies de hongos MA tenían efectos variables sobre el crecimiento de las plantas hospedadoras, sugiriendo que podría haber una variación en la función de los hongos MA en el campo. Por lo tanto, es posible que los genotipos difieran en sus requisitos de crecimiento y que las complejas interacciones con el ambiente promuevan que la colonización de MA se mantenga bajo situaciones no favorables, lográndose un posible efecto compensatorio de las plantas en estos ecosistemas que beneficia a la interacción de MA (Lugo *et al.*, 2003).

### **3.5. CONCLUSIÓN**

La interpretación de los resultados permite plantear, que a nivel de especies individuales, el pastoreo impacta sobre la remoción de biomasa área (hipótesis de la limitación de carbono) en la planta hospedadora dependiendo potencialmente de la selectividad que el animal realiza en su consumo para poder magnificar el efecto negativo en la simbiosis cuando se manejan altas cargas animales. Se debe prestar atención a las especies *Poa duseinii* y *Rytidosperma virescens* en la colonización de MA dado que las MA podrían influir en la supervivencia de estas especies. En una visión más integrada donde se ve que pasa a nivel de comunidad de plantas (áreas ecológicas) ese efecto que ejerce el pastoreo sobre la limitación del carbono a nivel del ecosistema queda enmascarada por la integración de diferentes especies vegetales que conforman la comunidad vegetal. Además, la red de hifas interconectadas que comunican las raíces de las plantas vecinas atenuarían los efectos negativos sobre la colonización de raíces en el suelo, donde la respuesta al pastoreo también pasa a depender de otro factor externo a la simbiosis como el las características del suelo y la relación costo-beneficio experimentada por la planta hospedadora.



## **Capítulo 4**

# **INFLUENCIA DE LA FERTILIZACIÓN Y EL ESTADO HÍDRICO DEL SUELO SOBRE LA MICROBIOTA EDÁFICA EN ECOSISTEMAS DE PATAGONIA SUR**

#### 4. 1. INTRODUCCIÓN

Los microorganismos del suelo son importantes para los ecosistemas, al estar involucrados en el ciclo de los nutrientes, la mineralización de restos orgánicos, la formación de agregados y humus del suelo (Emmerling *et al.*, 2002; Buscot y Varma, 2005). La biomasa microbiana del suelo es considerada como un agente catalítico en los procesos biogeoquímicos, siendo un reservorio de energía y nutrientes susceptible a cambios por manejos agronómicos, contribuyendo a caracterizar la calidad y fertilidad del suelo en el tiempo (Powelson, 1994; Haynes, 2000; Kheirfam, 2020).

En Patagonia Sur, existe un marcado gradiente del contenido de nutrientes en los suelos (ej., el stock total de N varía de 0,13 a 2,21 Kg N m<sup>-2</sup>) dependiendo de los biomas, precipitaciones y temperaturas particulares de cada ambiente (Peri *et al.*, 2019), lo cual podría incidir en la respuesta de los microorganismos del suelo. Considerando que los nutrientes del suelo mantienen funciones ecológicas clave, como la productividad de las plantas y el funcionamiento de los microorganismos en los procesos del suelo. Algunos trabajos no mostraron un efecto significativo en la comunidad microbiana cuando los suelos fueron fertilizados (Strecker *et al.*, 2015; Zhu *et al.*, 2016; Guo *et al.*, 2019), otros ensayos de fertilización a largo plazo determinaron respuestas significativas en la población de microorganismos y su funcionalidad (Marschner *et al.*, 2003; Chu *et al.*, 2007; Cinnadurai *et al.*, 2013) como el aumento de la biomasa microbiana (Peacock *et al.*, 2001; Kaur *et al.*, 2005). Según Zhong *et al.* (2010) una fertilización balanceada responde a las demandas nutricionales de las plantas y promueve el aumento de la biomasa microbiana. El aporte de nitrógeno, nutriente limitante para el crecimiento de las plantas en suelos semiáridos (Mott *et al.*, 1985), repercute de manera positiva en la actividad microbiana (Alexander, 1980) al promover el desarrollo de raíces, exudados y acumulación de residuos vegetales en el suelo como fuente de energía y alimento para los microorganismos (Brookes *et al.*, 1990; Omay *et al.*, 1997). Sin embargo, la disponibilidad de N en el suelo muchas veces resulta en una fuerte competencia entre plantas y microorganismos (Vitousek y Howart, 1991).

Otro aspecto, son los escenarios futuro de las predicciones de cambio climático que indican cambios en los patrones de precipitaciones con aumentos en las frecuencias de eventos climáticos extremos, como sequías y lluvias torrenciales (Houghton *et al.*, 2001; IPCC 2013). Para la región de Patagonia Sur, se predice un aumento de las temperaturas de 2 a 3°C para el año 2080 (Kreps *et al.*, 2012). Esto determinaría

cambios en el contenido de humedad del suelo lo cual tendría implicancias sobre los microorganismos del ambiente edáfico (Fierer y Schimel, 2003; Saetre y Stark, 2005). En general, las mejores condiciones de humedad del suelo incrementan la biomasa, actividad microbiana y una mayor diversidad de microorganismos, acompañado por una mayor funcionalidad de la microbiología del suelo (Kandeler y Bohm, 1996; Fierre y Schimel, 2003). Por otra parte, en estudios de sequía (control de la precipitación) determinaron que los microorganismos del suelo redujeron la biomasa microbiana y su actividad durante las sequías (Jensen *et al.*, 2003; Alster *et al.*, 2013). En ecosistemas naturales, la menor actividad microbiana está asociada con el estrés hídrico durante la temporada climática seca, en la cual gran parte de los microorganismos del suelo mueren o permanecen inactivos (Shing *et al.*, 1989). Brock *et al.* (1984) señaló que la actividad microbiana después de un periodo de sequía no se modificó a pesar que se humedezca el suelo, dado por la lisis celular que sufrieron los microorganismos. Si bien las bacterias son más dependientes de las películas de agua sobre las partículas de suelo para su movilidad y actividad, en relación a los hongos (Rosacker y Kieft, 1990; Killham, 1994), los cambios de biomasa microbiana en condiciones de sequía estarían representadas por comunidades de microorganismos generalistas tolerantes a la sequía (Yuste *et al.*, 2011; Fuchslueger *et al.*, 2014).

En consecuencia, resulta de importancia poder entender cómo responden los microorganismos del suelo frente a escenarios de cambios en el patrón de las precipitaciones, sequía y contenido de nutrientes en ecosistemas semiáridos de la estepa en Patagonia Sur, que presentan limitada disponibilidad de agua y nutrientes en suelo. Es por ello, que el objetivo del presente capítulo fue estudiar experimentalmente la influencia de del aporte de nutrientes (fertilización) y escenarios de variaciones de la precipitación (riego y sequía) en ambientes de la estepa magallánica seca sobre el carbono de la biomasa microbiana (C-BM), respiración biológica del suelo (RBS) y los coeficientes metabólicos microbianos. Las hipótesis son, la fertilización y el riego aplicados al suelo tendrán un efecto positivo sobre la biomasa microbiana y la respiración biológica del suelo. Por el contrario, condiciones de sequía se relacionarán de manera inversa con la biomasa microbiana y la respiración del suelo.

## 4.2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.2.1. Sitios de estudio

Los ensayos están enmarcados dentro de las parcelas permanentes de la Red Internacional de aportes de Nutrientes NutNet (<http://www.nutnet.umn.edu>) y de simulación de sequía “DroughtNet” (<http://wp.natsci.colostate.edu/droughtnet/>) que estudian respuestas ecológicas, funcionales y productivas de los pastizales respecto a los aportes de nutrientes (fertilizantes) y a la baja disponibilidad de agua en el suelo (sequia). Las parcelas fueron instaladas en el año 2015 y están ubicadas en el campo experimental Potrok Aike de la EEA-INTA Santa Cruz (51° 54' 57.7"LS - 70° 24' 26.8" LO) en un área homogénea de 2 ha clausurada hace aproximadamente 25 años, donde predomina un ecosistema de pastizales de la estepa magallánica seca.

### 4.2. 2. Caracterización del sitio de estudio

La temperatura media anual del área de estudio es de 6,1 °C con mínimas y máximas anuales de 1,5 a 11,8 °C, respectivamente. Las precipitaciones se distribuyen casi uniformemente en los semestres cálidos (septiembre-marzo) y fríos (abril-agosto) con una media anual histórica 178 mm ( $\pm 48$ ) (Tabla 4.1).

Para caracterizar el suelo del sitio donde se instalaron las parcelas, se tomaron un total de 9 muestras por tratamiento (3 por parcela) las cuales estaban compuestas por 10 submuestras de los primeros 5 cm de profundidad. El suelo corresponde al orden Aridisol de textura franco arenoso, rica en materia orgánica y con un pH ligeramente ácido (Tabla 4. 1).

La cobertura de suelo por comunidades vegetales se realizó con el método de puntos (Levy y Madden, 1993) con transectas de 30 m de largo y estimaciones cada 10 cm (300 puntos por transectas) dentro de las 2 hectáreas de la clausura (Tabla 4.1), el porcentaje de cobertura del suelo tuvo el gradiente de coironal e Intercoironal > suelo desnudo > herbáceas, subarbusto y mantillo > arbustos. La comunidad vegetal en el sitio del estudio está dominado por Coironales de (*Festuca spp.* y *Pappostipa spp.*), Intercoironal (*Poa spp.*, *Carex spp.* y *Rytidosperma virescens*), subarbustos (*Nardophyllum bryoides*, *Junellia ódonellii*, *Nassauvia aculeata* y *Azorella monantha*) y herbáceas como (*Luzula chilensis*, *Perezia recurvata* y *Acaena poeppigiana*) y arbustos (*Berberis spp.*).

**Tabla 4. 1.** Caracterización del sitio de estudio con los valores medios ( $\pm$ DE) para las variables climáticas (temperatura y precipitación) (<http://sipas.inta.gob.ar/>), parámetros químicos de suelo (pH, macro y micronutrientes) y cobertura de suelo por comunidades vegetales, correspondientes al suelo de la donde están instalados los ensayos de Nutriente y Sequía enmarcados dentro de la Red Internacional Drought y Nut Net en los pastizales semiáridos de la Patagonia Sur Argentina.

Clima		Suelo		Vegetación	
<b>Precipitación (mm)</b>				<b>Cobertura (%)</b>	
<b>Media Anual</b>	178 ( $\pm$ 48)	<b>Textura</b>	Franco arenosa	<b>Suelo Desnudo</b>	16,92 ( $\pm$ 10,13)
<b>Media Semestre Cálido</b>	97 ( $\pm$ 11)	<b>pH</b>	6,50 ( $\pm$ 0,20)	<b>Mantillo</b>	8,42 ( $\pm$ 17,03)
<b>Media Semestre Frío</b>	94 ( $\pm$ 11)	<b>C org (%)</b>	2,32 ( $\pm$ 0,29)	<b>Coironal</b>	29,89 ( $\pm$ 11,84)
<b>Temperatura (°C)</b>		<b>N (%)</b>	0,28 ( $\pm$ 0,03)	<b>Intercoironal</b>	26,19 ( $\pm$ 13,33)
<b>Media Anual</b>	6,1 ( $\pm$ 0,2)	<b>C/N</b>	8,29 ( $\pm$ 3,90)	<b>Sub arbusto</b>	8,56 ( $\pm$ 11,67)
<b>Media Semestre Cálido</b>	8,8 ( $\pm$ 0,4)	<b>P (ppm)</b>	24,50 ( $\pm$ 5,70)	<b>Arbusto</b>	0,19 ( $\pm$ 0,17)
<b>Media Semestre Frío</b>	3,3 ( $\pm$ 0,9)	<b>K (ppm)</b>	278,30 ( $\pm$ 51,80)	<b>Herbácea</b>	9,83 ( $\pm$ 5,75)
<b>Máxima Media Anual</b>	11,8 ( $\pm$ 2,4)	<b>Ca (ppm)</b>	1826,10 ( $\pm$ 182,20)		
<b>Máxima Semestre Cálido</b>	14,8 ( $\pm$ 0,5)	<b>Mg (ppm)</b>	475,10 ( $\pm$ 55,10)		
<b>Máxima Semestre Frío</b>	7,5 ( $\pm$ 0,4)	<b>S (ppm)</b>	14,10 ( $\pm$ 2,70)		
<b>Mínima Anual</b>	1,5 ( $\pm$ 1,4)	<b>Na (ppm)</b>	63,40 ( $\pm$ 20,00)		
<b>Mínima Semestre Cálido</b>	2,9 ( $\pm$ 0,2)	<b>Zn (ppm)</b>	3,70 ( $\pm$ 1,00)		
<b>Mínima Semestre Frío</b>	-0,7 ( $\pm$ 0,4)	<b>Mn (ppm)</b>	475,10 ( $\pm$ 55,10)		

#### 4. 2. 3. Ensayo de variación de la precipitación (sequía y riego)

El desarrollo del experimento de simulación de la precipitación consiste en tres tratamientos con tres repeticiones cada uno, teniendo como unidad experimental parcelas de 4 m<sup>2</sup> que están distribuidas al azar en el área de estudio. Los tratamientos son:

**A)** Tratamiento de precipitación ambiental (Control)

**B)** Tratamiento reducción (-54 %) de la precipitación ambiental (Sequía)

**C)** Tratamiento de suplementación (+54 %) de precipitación (Riego).

Para generar las condiciones de sequía, se colocaron estructuras fijas que reducen en forma pasiva un porcentaje de la precipitación mediante el uso de interceptores (Fig. 4.1). El nivel de la extremidad de la sequía fue estimado según se establece por la Red de Sequía ([www.drought-net.org](http://www.drought-net.org)), donde la cantidad total de la reducción de precipitaciones se cuantificó sobre los registros de largo plazo de precipitaciones desde 1896 de Río Gallegos (cercano al lugar de estudio). Las precipitaciones medias anuales históricas registradas en el área de estudio, permitieron estimar que aproximadamente el 54% de las lluvias deberían ser interceptadas, dado que este valor simula una sequía extrema, equivalente a la lluvia que ocurre en 1 a 10 años en una serie de 100 años (Yahdjian y Sala, 2002).

El tratamiento de suplementación de precipitación, se realizó a través de riegos (uso de regadera). Se aplicó una lámina anual con la misma cantidad de agua retenida por las estructuras (+54 % de precipitación media anual de largo plazo) en un total de 6

riegos programados durante la temporada de crecimiento de las plantas (primavera-verano). Los datos de los mm de agua que llegaron al suelo por cada tratamiento fueron registrados para los periodos del estudio (Tabla 4. 2).

**Tabla 4. 2.** Registros de mm de agua aportados al suelo para cada tratamiento del ensayo (Control, Sequía y Riego) durante el periodo 2015 al 2017 en la estepa magallánica seca de la Patagonia Sur.

Periodo del ensayo	Total de mm/año de agua en el suelo por tratamiento		
	Control	Sequía	Riego
2015/2016	155,8	71,7	278,3
2016/2017	197,8	90,9	342,8

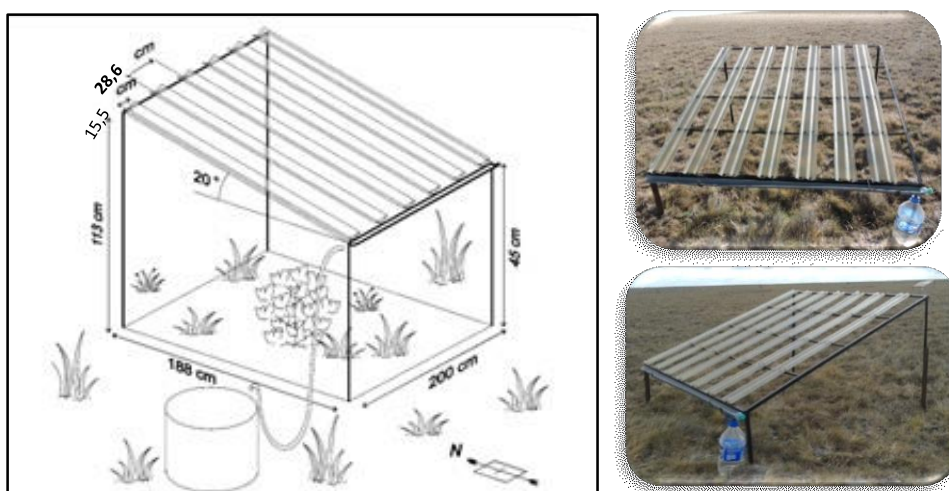


Fig. 4.1. Esquema del Interceptor de precipitaciones (intercepción del 54%) y fotos de las estructuras instaladas en el campo Experimental Potrok Aike del INTA en la Estepa Magallánica Seca, para lograr el tratamiento de extrema sequía en el marco del ensayo DroughNet.

#### 4. 2. 4. Ensayo de nutrientes

En las parcelas de la Red NutNet se seleccionaron para el presente estudio tres de los diez tratamientos del ensayo completo (Fig. 4.2), los cuales tienen un diseño factorial aleatorizado con tres repeticiones, donde la unidad experimental (parcela) tiene un tamaño de 5 x 5 m.

Los tratamientos son los siguientes:

- A)** Tratamiento de aplicación de macro y micronutrientes (NPK+)
- B)** Tratamientos de aplicación de nitrógeno solo (N)
- C)** Tratamiento Control (C)

Figure 1 shows an aerial view of a 5m x 5m experimental plot. The plot is divided into 25 sub-plots, each labeled with the presence (+) or absence (-) of Nitrogen (N), Phosphorus (P), and Potassium (K). A 25m² area is highlighted with a dashed line, and an arrow points to a diagram of a 5m x 5m plot labeled 'Parcela de 25m²'.

Nutrientes	Fertilizante Aplicado	Composición del Fertilizante	Concentración del Nutriente en el Fertilizante (%)	Fertilizante aplicado (g/m <sup>2</sup> )
------------	-----------------------	------------------------------	--	---

#### **4. 2. 5. Determinación de las variables de precipitación, temperatura y biomasa área vegetal durante los periodos del estudio (2015-2017)**

La precipitación y temperatura registradas durante el período del estudio fueron tomadas de la estación meteorológica ubicada en el campo experimental Potrok Aike de la EEA-INTA Santa Cruz, ubicada a 5 km del sitio de las parcelas de los ensayos de fertilización y simulación de la precipitación.

La producción aérea vegetal anual se midió durante el pico de producción de la biomasa durante los periodos 2015/2016 y 2016/2017, realizando cortes con un marco de 0,2 m<sup>2</sup> en cada repetición de cada tratamiento. Las muestras se secaron en horno a 60 °C hasta peso constante, se pesaron y se calculó la producción de materia seca de la biomasa aérea vegetal expresada en g/m<sup>2</sup>.

#### **4. 2. 6. Microbiología del suelo**

Para la determinación de variables de microbiología del suelo los muestreos se realizaron al finalizar la estación de crecimiento de las plantas (inicio de otoño) durante los años 2016-2017. Se tomaron tres muestras de suelo por repetición (n=9 por tratamiento), las cuales estuvieron compuestas de 10 submuestras de los primeros 5 cm de profundidad (sin residuos vegetales) de suelo tomados con un cilindro metálico (5.6 cm de diámetro). Las muestras fueron mantenidas refrigeradas a 4 °C hasta su procesamiento en laboratorio.

Carbono de la biomasa microbiana (C-BM): La estimación del C-BM se realizó mediante el método de fumigación-extracción (Vance *et al.*, 1987). (Para más detalle, ver sección 2.2.3.1 del Capítulo 2).

Respiración biológica del suelo (RBS): La medición de CO<sub>2</sub> resultante de la respiración potencial del suelo, se realizó a través de la técnica de incubación aeróbica en condiciones óptimas de humedad y temperatura (Robertson *et al.*, 1999). (Descripción más detallada en sección 2.2.3.3 Capítulo 2).

El coeficiente metabólico microbiano (qCO<sub>2</sub>) se determinó como la relación entre el C-CO<sub>2</sub> producto de la respiración del suelo y el C de la biomasa microbiana (Anderson y Domsch, 1990, 1993). El cociente microbiano (qM) fue determinado como la relación C-BM/C-orgánico suelo que refleja la contribución de la biomasa microbiana al C orgánico del suelo, expresado en porcentaje (Anderson y Domsch, 1986, 1993).



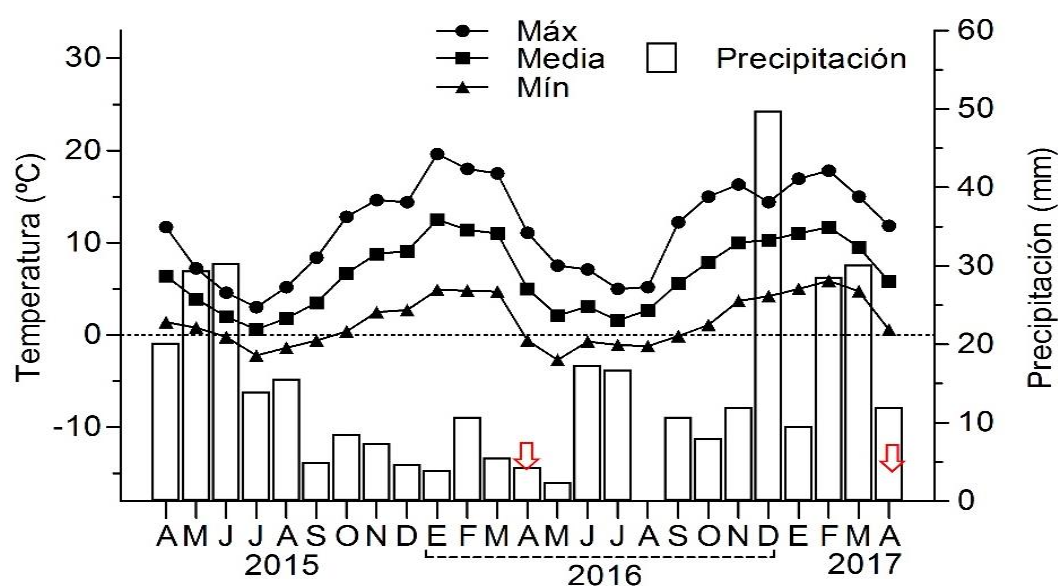
#### **4. 2. 7. Análisis Estadístico**

Los datos fueron analizados utilizando el software INFOSTAT (Di Rienzo *et al.*, 2013). A las variables de clima, vegetación y suelo se realizó un análisis descriptivo de las medias y los desvíos estándar. Los datos de C-BM, RBS, qCO<sub>2</sub> y qM fueron analizados por medio de ANOVA de un factor, utilizando en el ensayo de nutrientes el factor tratamientos con sus 3 niveles (N, NPK+ y C) y para los ensayos de sequía los 3 niveles del factor fueron riego, sequía y control. Las diferencias significativas entre medias fueron separadas con el test de Tukey con un nivel de significancia de  $p < 0,05$ . Se realizaron análisis de correlación de Pearson entre las variables de biomasa aérea vegetal y los parámetros microbiológicos (C-BM, RSB, qCO<sub>2</sub>, qM) considerando la fuerza de la relación lineal (-1 a +1) y un valor de  $p < 0,05$ . Se realizaron regresiones lineales simples entre las variables biomasa aérea total y C-BM y los mm de agua aportados al suelo.

### **4. 3 RESULTADOS**

#### **4.3.1 Precipitaciones y temperaturas en el sitio del estudio**

Los datos registrados de las variables climáticas (precipitación y temperatura) durante el periodo (abril de 2015 a abril 2017), se describen para el sitio de estudio del ensayo de nutrientes y sequía (Fig. 4.3). Las temperaturas medias mensuales estuvieron cerca de 0 °C en los meses de otoño-inverno, y 12 °C en primavera-verano. Las temperaturas mínimas medias mensuales variaron de -3 a 5 °C y las temperaturas máximas entre 5 y 15 °C. Los valores de precipitaciones anuales en el sitio del ensayo fluctuaron de 155,8 mm en el periodo de un año que va desde abril de 2015 a 2016 y de 197,8 mm para el periodo comprendido entre 2016 y 2017 (Fig. 4.3).



**Figura 4.3.** Valores medios de precipitación y temperaturas del aire (mínimas, medias y máximas) mensuales registradas durante el periodo de evaluación (2015 a 2017) del ensayo de nutrientes y sequía, (flechas rojas indican el momento de toma de muestras de suelo).

## 4.3. 2. Ensayo de Nutrientes

### 4.3.2. 1 Biomasa aérea vegetal

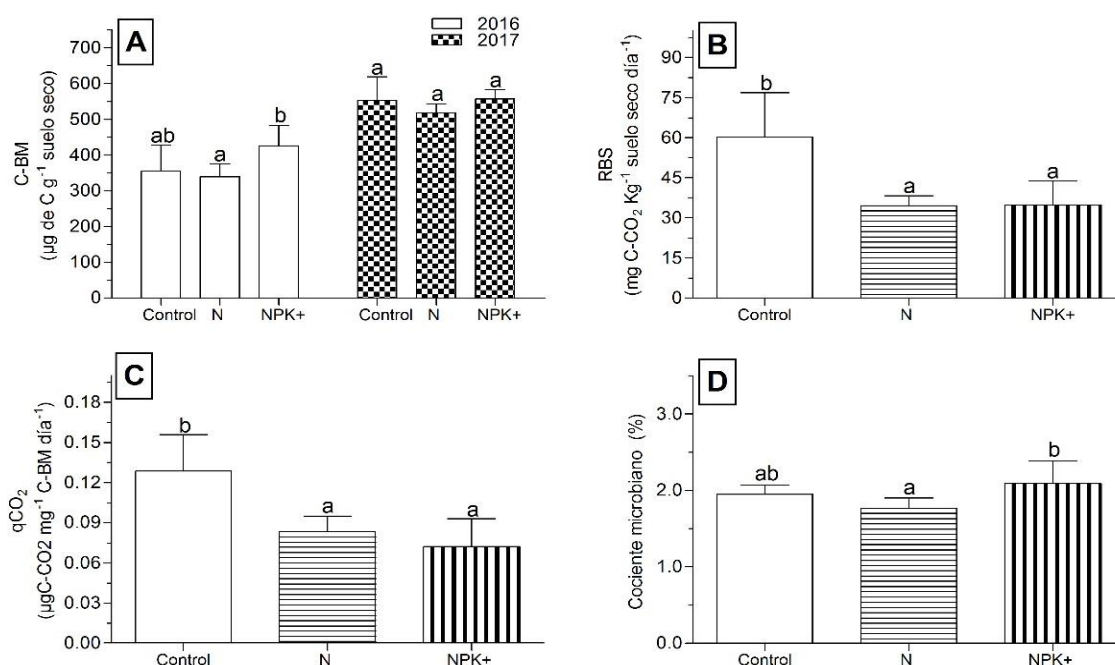
La producción de biomasa aérea vegetal total fue mayor ( $p < 0,05$ ) en el tratamiento NPK+ respecto al control en el período de menor precipitación 2015-2016, determinado principalmente por el crecimiento de gramíneas y proporción de material muerto en pie (Tabla 4.4). La biomasa aérea leñosa tuvo una variación entre periodos con mayores valores en el 16/17 en todos los tratamientos. La producción de materia seca de gramíneas (fracción verde) fue mayor ( $p < 0,05$ ) en el tratamiento NPK+ en ambos años (Tabla 4.4).

**Tabla 4.4.** Producciones de materia seca ( $\text{g/m}^2$ ) de la biomasa vegetal aérea leñosa, gramíneas y muertas en pie durante los periodos 15/16 y 16/17 en el ensayo de fertilización en las parcelas permanentes de NutNet en los pastizales de la Patagonia Sur Argentina. Letras distintas indican diferencias estadísticas significativas ( $p < 0,05$ ) dentro de cada periodo.

Producción Materia Seca ( $\text{g/m}^2$ )	Periodos					
	2015-2016			2016-2017		
	Control	N	NPK+	Control	N	NPK+
<b>Muerto en pie</b>	29 ( $\pm 9$ ) a	53 ( $\pm 30$ ) ab	83 ( $\pm 17$ ) b	43 ( $\pm 38$ ) a	85 ( $\pm 50$ ) a	92 ( $\pm 42$ ) a
<b>Gramíneas</b>	26 ( $\pm 9$ ) a	41 ( $\pm 2$ ) ab	47 ( $\pm 9$ ) b	29 ( $\pm 22$ ) a	52 ( $\pm 3$ ) ab	76 ( $\pm 10$ ) b
<b>Leñosas</b>	2 ( $\pm 1$ ) a	7 ( $\pm 5$ ) a	3 ( $\pm 4$ ) a	23 ( $\pm 26$ ) a	36 ( $\pm 13$ ) a	28 ( $\pm 47$ ) a
<b>Total</b>	57 ( $\pm 18$ ) a	100 ( $\pm 32$ ) ab	133 ( $\pm 23$ ) b	95 ( $\pm 41$ ) a	173 ( $\pm 51$ ) a	197 ( $\pm 90$ ) a

#### 4.3.2. 2 Microbiología del suelo

Los resultados del C-BM evaluados variaron significativamente entre años ( $p < 0,05$ ), con valores superiores en el año 2017 con mayores precipitaciones. La fertilización del suelo afectó significativamente al C-BM solo en el año 2016, con valores superiores en el tratamiento de aplicación de fertilizante NPK+ (Fig. 4.4A). La respuesta de la RBS varió significativamente con los tratamientos de fertilización del suelo, donde los tratamientos NPK+ y N disminuyeron en un 42 % respecto al control (Fig. 4.4B). Asimismo, el  $qCO_2$  presentó valores superiores ( $p < 0,05$ ) en el control respecto a los tratamientos de fertilización N y NPK+ (Fig. 4.4C). El qM presentó diferencias ( $p < 0,05$ ) entre los tratamientos de fertilización, con valores superiores en el tratamiento NPK+ (Fig. 4.4D).



**Figura 4.4.** (A) Carbono de la biomasa microbiana (C-BM  $\mu\text{g}$  de C/g suelo seco), (B) respiración biológica de suelo (RBS  $\text{mg}$  de C- $\text{CO}_2/\text{Kg}$  suelo seco/día), (C) coeficiente metabólico ( $q\text{CO}_2$   $\mu\text{gC-CO}_2/\text{mg}$  C-BM/día), (D) cociente microbiano (qM %) para los tratamientos de fertilización: Macro y Micronutrientes (NPK+), Nitrógeno solo (N) y Control (C) de las parcelas permanentes de la Red NutNet en los pastizales de la Patagonia Sur Argentina. Letras distintas indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

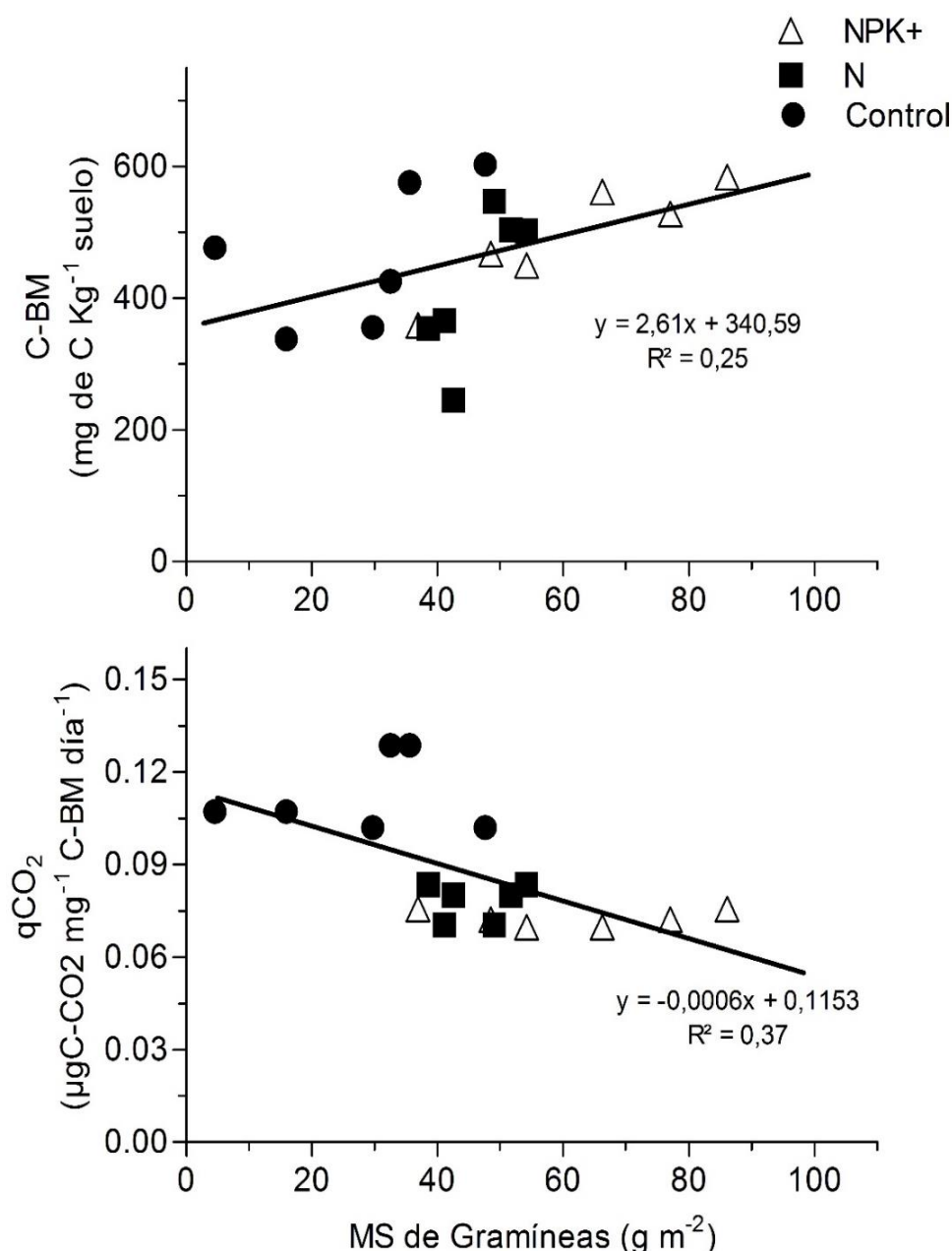
#### 4.3.2.3 Relaciones entre las variables microbiológicas y la biomasa vegetal

Se observó una correlación positiva ( $p < 0,05$ ) entre el C-BM y la biomasa aérea vegetal total y de gramíneas. Además, se encontró que la biomasa aérea total, de gramíneas y la biomasa muerto en pie estuvieron correlacionadas negativamente con el  $q\text{CO}_2$  en los suelos de las parcelas del ensayo de fertilización (Tabla 4. 5).

**Tabla 4.5.** Índices de correlación de Pearson del C-BM, RBS, qCO<sub>2</sub>, qM con las variables de biomasa vegetal aérea (g/m<sup>2</sup>) total, gramíneas, leñosa y muerto en pie en las parcelas del ensayo de fertilización NUTNET en los pastizales de Patagonia Sur Argentina. (\*) Determina la significancia con un p<0,05.

Variables	MS Total	MS Gramíneas	MS Muerto en pie	MS Leñosa
<b>C-BM</b>	<b>0,46*</b>	<b>0,50*</b>	0,34	0,3
<b>RBS</b>	-0,40	-0,39	-0,36	-0,2
<b>qCO<sub>2</sub></b>	<b>-0,57*</b>	<b>-0,60*</b>	<b>-0,56*</b>	-0,15
<b>qM</b>	-0,02	0,16	1,30E-03	-0,18

La materia seca de gramíneas en el análisis de regresión con el C-BM determinó una relación lineal positiva ( $p < 0,05$ ) en los suelos de los tratamientos de fertilización, con los valores más bajos para el control en comparación a los de N y NPK+ (Fig 4.5A). Por el contrario, la producción de materia seca aérea de gramíneas tuvo una relación negativa con el qCO<sub>2</sub> (Fig. 4.5B).



**Figura 4.5.** Relación de la biomasa aérea de gramíneas expresada en materia seca (g m<sup>-2</sup>) con el C-BM (a) y qCO<sub>2</sub> (b) en las parcelas del ensayo de fertilización para los tratamientos de macro-micro nutrientes (NPK+), nitrógeno (N) y control en los pastizales de Patagonia sur Argentina.

### 4.3. 3 Ensayo de variación de la precipitación

#### 4.3.3. 1 Biomasa aérea vegetal

La producción de biomasa aérea vegetal total mostró el gradiente riego>control>sequía en ambos periodos de crecimiento del ensayo de simulación de la precipitación. La producción de materia seca leñosa representó el menor valor de biomasa aérea en todos los tratamientos, con valores distintos sólo en 2016-2017. La producción de materia de gramíneas varió entre años, en los dos periodos; y con

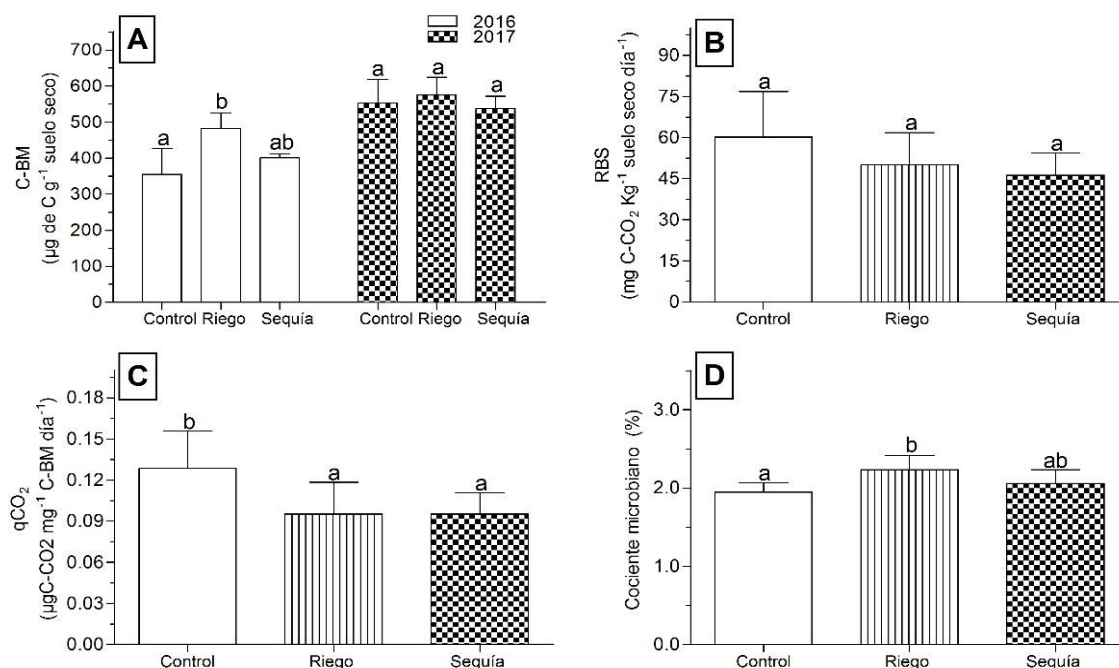
mayor biomasa aérea vegetal en el 2016-2017. Por otro lado, la materia seca del componente muerto en pie no varió en función de los tratamientos (Tabla 4.6).

**Tabla 4.6.** Producción de materia seca ( $\text{g/m}^2$ ) de la biomasa vegetal aérea leñosa, gramínea y muerta en pie durante los periodos 15/16 y 16/17 en el ensayo de simulación de la precipitación en las parcelas permanentes de DroughtNet en los pastizales de la Patagonia Sur Argentina. Letras distintas indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre tratamiento dentro de cada periodo de crecimiento.

Producción Materia Seca ( $\text{g/m}^2$ )	Periodos					
	2015-2016			2016-2017		
	Control	Riego	Sequía	Control	Riego	Sequía
<b>Muerto en pie</b>	60 ( $\pm 14$ ) a	79 ( $\pm 34$ ) a	74 ( $\pm 37$ ) a	66 ( $\pm 7$ ) a	65 ( $\pm 20$ ) a	48 ( $\pm 6$ ) a
<b>Gramíneas</b>	54 ( $\pm 9$ ) ab	86 ( $\pm 34$ ) b	36 ( $\pm 11$ ) a	70 ( $\pm 26$ ) ab	105 ( $\pm 34$ ) b	50 ( $\pm 10$ ) a
<b>Leñosas</b>	9 ( $\pm 11$ ) a	8 ( $\pm 14$ ) a	9 ( $\pm 8$ ) a	7 ( $\pm 6$ ) a	21 ( $\pm 8$ ) a	7 ( $\pm 7$ ) a
<b>Total</b>	123 ( $\pm 14$ ) ab	173 ( $\pm 63$ ) b	109 ( $\pm 20$ ) a	143 ( $\pm 25$ ) ab	191 ( $\pm 22$ ) b	105 ( $\pm 23$ ) a

#### 4.3.3. 2 Microbiología del suelo

El C-BM varió significativamente en el año 2016 ( $p < 0,05$ ), y mostró una tendencia a valores superiores en el año 2017. El tratamiento con riego determinó un aumento significativo ( $p < 0,05$ ) del C-BM en el año 2016 respecto al control (Fig. 4.6A). La RBS evaluada en las distintas condiciones de simulación de la precipitación no presentó diferencias estadísticas entre tratamientos (Fig. 4.6B). Por otra parte, el  $\text{qCO}_2$  tuvo valores superiores en el tratamiento control (23 %) con significancia estadística ( $p < 0,05$ ) respecto a los tratamientos riego y sequía (Fig. 4.6C). El qM presentó diferencias ( $p < 0,05$ ) entre los tratamientos, con valores superiores en el tratamiento de riego y menor valor para el control (Fig. 4.6D).



**Figura 4.6.** (A) Carbono de la biomasa microbiana (C-BM  $\mu\text{g de C/g suelo seco}$ ), (B) respiración biológica de suelo (RBS  $\text{mg de C-CO}_2/\text{Kg suelo seco/día}$ ), (C) coeficiente metabólico ( $\text{qCO}_2 \mu\text{gC-CO}_2/\text{mg C-BM/día}$ ), (D) cociente microbiano (qM %) para los tratamientos de simulación de la precipitación: Riego, Sequía y Control (C) de las parcelas permanentes de la Red DroughtNet en los pastizales de la Patagonia Sur Argentina. Letras distintas indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

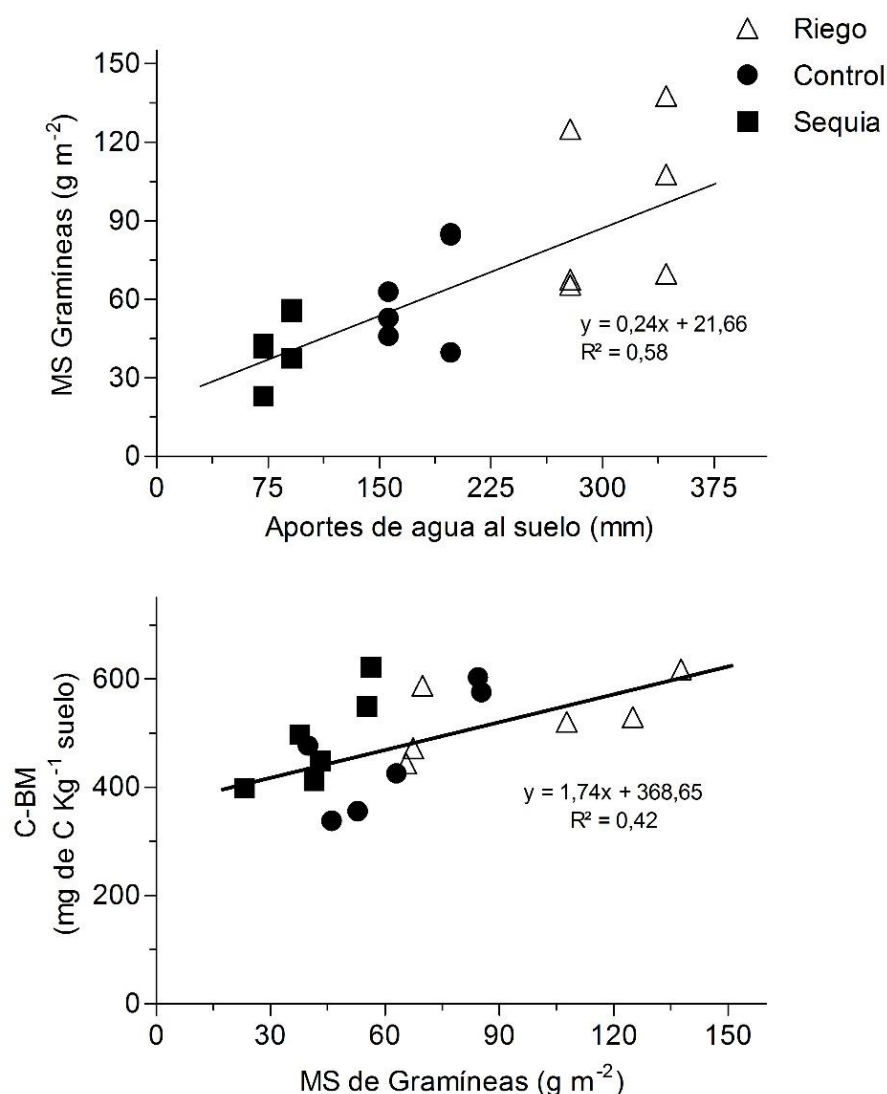
#### 4.3.3. 3 Relaciones entre las variables microbiológicas de suelo, la biomasa y agua aportada al suelo

Se determinó una correlación entre los parámetros microbiológicos, la biomasa área vegetal y la cantidad de agua aportada al suelo por precipitación y/o riego. El C-BM y el qM se correlacionaron positivamente ( $p < 0.05$ ) con la biomasa área total y de gramíneas. También se observó una correlación positiva significativa entre la biomasa total y de gramíneas con la lámina de agua recibida (Tabla 4.7).

**Tabla 4.7.** Índices de correlación de Pearson del C-BM, RBS,  $\text{qCO}_2$ , qM con las variables de biomasa vegetal aérea ( $\text{g/m}^2$ ) total, gramíneas, leñosa, muerto en pie y los mm de agua aportados al suelo (precipitación y/o riego) en las parcelas del ensayo de simulación de la precipitación DROUGHTNET en los pastizales de Patagonia Sur Argentina. (\*) Determina la significancia con un  $p < 0.05$ .

Variables	MS Total	MS Gramíneas	MS Muerto en pie	MS Leñosa	mm de agua
C-BM	0,52*	0,57*	0,1	0,11	0,37
RBS	0,09	0,04	-0,01	0,19	0,09
$\text{qCO}_2$	-0,28	-0,2	-0,03	-0,25	-0,26
qM	0,35	0,54*	0,02	-0,2	0,47
mm de agua	0,78*	0,76*	0,17	0,35	-

La cantidad de agua aportada al suelo en los tratamientos de sequía, control y riego presentó una relación lineal positiva ( $p < 0,05$ ) con la biomasa aérea vegetal de gramíneas, explicando el 58 % de la variación (Fig. 4.7 a). También, se encontró que la producción de materia seca aérea de gramíneas tuvo una relación positiva con el C-BM en los suelos de las parcelas del ensayo de simulación de la precipitación (Fig. 4.7b).



**Figura 4.7.** Relación de la biomasa aérea de gramíneas expresada en materia seca ( $\text{g m}^{-2}$ ) con los mm de agua aportados al suelo por precipitación y/o riego (a) y el C-BM (b) en las parcelas del ensayo de simulación de la precipitación DroughtNet para los tratamientos de Riego, Control y Sequía en los pastizales de Patagonia sur Argentina.



## 4. 4. DISCUSIÓN

### 4. 4. 1. Biomasa vegetal y variables microbiológicas en el ensayo de nutrientes

La biomasa aérea vegetal, y principalmente las gramíneas, aumentó en los tratamientos de fertilización (N y NPK+) comparados con el control, dependiendo su magnitud en función de los periodos de crecimiento. La respuesta positiva de la producción de materia seca vegetal a la fertilización fue coincidente con estudios previos (Zhu *et al.*, 2015; Duran *et al.*, 2016). Pietikäinen *et al.* (2005) en pastizales subárticos con similares características climáticas al presente estudio, han observado esta misma tendencia de la respuestas de la biomasa aérea vegetal de gramíneas cuando los suelos fueron fertilizados. El efecto de fertilización fue significativo en la biomasa aérea total durante el primer periodo del ensayo, con una tendencia de biomasa vegetal mayor en NPK+ > N > control. Brueck *et al.* (2010) describieron que la fertilización de los suelos y la respuesta del crecimiento en biomasa de las plantas están condicionada por la disponibilidad de agua en los suelos de los pastizales áridos y semiáridos. Por esta razón, al analizar los resultados de la biomasa vegetal y como fueron las precipitaciones durante los periodos del ensayo (Fig 4.3) se puede plantear que hubo una interacción entre la fertilización y las precipitaciones inter-anales de los periodos y las respuestas de la biomasa aérea vegetal en nuestro estudio, siendo la respuesta de mayor magnitud en el período de crecimiento con mayores precipitaciones (2016-2017).

La fertilización tuvo implicancias sobre los parámetros microbiológicos del suelo. El C-BM en nuestros resultados varió entre los años evaluados, siendo mayor en el período de crecimiento 2016-2017 con mayores precipitaciones (un 20% más que el primer período) (Fig 4.3). Dietrich *et al.* (2017) observaron esta misma variación interanual de la biomasa microbiana en su ensayo de fertilización sobre pastizales naturales templados. De igual manera, Geisseler y Horwath (2009) informaron una disminución de la biomasa microbiana con menor humedad del suelo. A pesar de ello, existen antecedentes con respuestas diferenciales del C-BM a la fertilización. Mientras, Strecker *et al.* (2015) han informado que el C-BM no se modificó cuando los suelos fueron fertilizados. En nuestro trabajo, la fertilización del suelo afectó significativamente al C-BM en el periodo 2015-2016 (período de crecimiento con menos precipitaciones), con valores superiores en el tratamiento de aplicación de fertilizante NPK+. Dietrich *et al.* (2017) determinaron un efecto significativo y positivo de la fertilización sobre el C-BM. Michelsen *et al.* (1999) en suelos del norte de Suecia,

aplicando la adición de fertilizantes NPK observaron un aumento del 30% de la biomasa microbiana a lo largo de varios años de ensayo, siendo el incremento del carbono de la biomasa microbiana producto del aporte de nutrientes al suelo. Según Zhong *et al.* (2010) una fertilización balanceada (NPK+) responde a la demanda nutricionales de las plantas y promueve el aumento de la biomasa microbiana. Ciertamente, las diferencias observadas en nuestro estudio en el C-BM bajo los tratamientos de fertilización estuvieron dadas por las variaciones de la biomasa vegetal (Tabla 4.4), y confirmada en las correlaciones entre ambas variables (Tabla 4.5). Liu *et al.* (2010) determinó en parcelas fertilizadas que existe una variabilidad temporal de la biomasa microbiana del suelo dadas por variaciones de la biomasa vegetal y que son modeladas por los factores ambientales, además observaron una correlación positivas entre la biomasa vegetal y la biomasa microbiana del suelo. Esto podría explicarse por la respuesta observada en el C-BM en nuestro estudio, dado que la biomasa vegetal difirió significativamente entre los tratamientos de fertilización en el periodo 2015-2016. De esta manera, los valores superiores de C-BM en el tratamiento NPK+ pudieron ser causados por mayores restos orgánicos de la biomasa aérea que llega al suelo, aumento en la biomasa y exudados de las raíces (Kent y Triplett, 2002; Bais *et al.*, 2006; Chu *et al.*, 2007; Lange *et al.*, 2015; Stevens *et al.*, 2016). Por otro lado, en nuestros resultados la fertilización nitrogenada no afectó significativamente al C-BM respecto al control, lo cual podría deberse a que la dosis es intermedia ( $10 \text{ g N m}^{-2}$ ) comparado al trabajo de Zhu *et al.* (2016) quienes determinaron que el C-BM aumentó con una dosis de fertilización nitrogenada de  $5,6 \text{ g N m}^{-2}$  y disminuyó cuando la dosis fue de  $22,4 \text{ g N m}^{-2}$ . Estas diferencias podrían estar relacionadas a las dosis nutrientes aplicadas, la fuente del fertilizante y ambientes con contrastantes precipitaciones. Treseder (2008) en meta-análisis determinó que los efectos de la fertilización sobre el C-BM están influenciados claramente por la dosis aplicada y el tiempo luego de la aplicación del fertilizante. Además, nuestros resultados podrían indicar que 2 años de ensayo desde la aplicación de los fertilizantes no serían suficientes para detectar cambios significativos sobre la biomasa microbiana en nuestros ambientes áridos de Patagonia.

A diferencia del C-BM, los resultados en este ensayo mostraron una disminución significativa en RBS del 42% en los suelos que fueron fertilizados en comparación al control. Stark y Grellmann (2002) evaluando la respuesta de la fertilización al norte de Noruega encontraron que la RBS fue reducida en suelos de la tundra ártica. También

Smolander *et al.* (1994) y Thakur *et al.* (2015) han encontrado que la fertilización disminuyó la respiración microbiana. La fertilización tiene efectos negativos en las actividades de las enzimas relacionadas al ciclo de los nutrientes (proteasa y ureasa) las cuales inhiben su actividad (Allison y Vitousek, 2005). De igual modo, Dick *et al.* (1988) y Eivazi *et al.* (2003) informaron una inhibición en los procesos bioquímicos debido a la fertilización inorgánica a largo plazo. Podría suponerse que la fertilización en nuestro sitio disminuyó la RBS dado por las menores actividades de las enzimas que intervienen en los procesos de mineralización de los compuestos orgánicos del suelo. Del mismo modo, Spohn *et al.* (2016) y Wang *et al.* (2017) han informado una disminución de la RBS cuando los suelos de pastizales y bosques fueron fertilizados, lo cual estaría dado por la menor asignación de carbono que se da a la respiración y mayor asignación de carbono al crecimiento microbiano y sumado a la mayor disponibilidad de nutrientes (Spohn, 2015). Otro aspecto, es la repuesta de la RBS a la fertilización nitrogenada en suelos con limitaciones de C o N, reflejados en la relación C/N (Micks *et al.*, 2004; Peng *et al.*, 2011). Los resultados supondrían una limitación de carbono para la actividad microbiana en nuestro sitio de estudio, al tener valores de la relación C/N cercanos a 8 (Tabla 4.1), que es considerablemente más bajo que el nivel óptimo de 25 para el crecimiento microbiano y la RBS, y que la adición de N agravó aún más la limitante del recursos C del suelo.

Dado que existen estudios que han informado que valores superiores de la relación C/N del suelo tendió a aumentar el RBS (Spohn, 2015). Sin embargo, Guo *et al.* (2019) no observaron diferencias significativas en la RBS en muestras incubadas en tratamientos de fertilización NPK en comparación con las parcelas control. Contrariamente a los resultados de nuestro estudio, Dietrich *et al.* (2017) encontró que la fertilización nitrogenada aumentó la RBS en suelos que tenían valores más altos de pH (7,19) y carbono orgánico (3,1%) comparado a nuestros suelos, siendo estos factores determinantes dado que se relacionan positivamente con la actividad de los microorganismos (Serna-Chavez *et al.*, 2013). Del mismo modo, un estudio mostró que la respiración del suelo en parcelas fertilizadas con N fue 11,4% mayor que parcelas no fertilizadas, determinado al crecimiento estimulado de las plantas y la actividad respiratoria de las raíces (Xu y Wan, 2008). Estas diferencias pueden estar dadas ya que, en nuestro estudio se determinó sólo el efecto de la respiración heterotrófica a la fertilización medido a través de la RBS, en el cual no se considera el aporte que hacen las raíces a la respiración total en el flujo de CO<sub>2</sub> del suelo a la

atmosfera. Por lo tanto, la adición de nutrientes al suelo y los efectos sobre la respiración del suelo podría tener una doble dirección en su respuesta, por un lado afectar positivamente la respiración autotrófica pero impactar negativamente la respiración heterotrófica (Söderström *et al.*, 1983). Posiblemente, en suelos de pastizales semiáridos los efectos de los fertilizantes en la actividad microbiana del suelo no son lineales y dependen de las condiciones ambientales y de la cantidad de fertilizante agregado (Zhu *et al.*, 2016).

Anderson y Domsch (1990, 1993) considera que los indicadores ecofisiológicos, como el cociente microbiano y metabólico están estrechamente asociados con la función de los microorganismo sobre la materia orgánica del suelo. En nuestros resultados la fertilización disminuyó el  $qCO_2$  en comparación con las parcelas control. Giacometti *et al.* (2013) y Strecker *et al.* (2015) han determinado que la fertilización afecta el cociente metabólico ( $qCO_2$ ), con valores más bajos en los tratamientos de aplicación de fertilizantes nitrogenados en comparación con sitios control. Esto puede indicar que, además de estimular el crecimiento de microorganismos (mayor C-BM) determinado en nuestro estudio, la fertilización favoreció el desarrollo de una comunidad microbiana energéticamente más eficiente (menor  $qCO_2$ ) dado por los valores de menor RBS. Asimismo, los valores de  $qM$  estuvieron entre los rangos informados previamente (Anderson, 2003) y con una tendencia de valores superiores en el tratamiento de fertilización NPK+ comparado con los otros tratamientos. Por lo tanto, parecería que la fertilización promovería la acumulación de carbono orgánico en los suelos relacionados por un mayor valor de  $qM$  y con valores superiores de C-BM determinados por el crecimiento de los microorganismos (Anderson y Domsch, 1986; Trinchera *et al.*, 2001).

Este estudio reveló que la fertilización mineral en el suelo arrojó una relación positiva entre el C-BM y la producción de biomasa vegetal total y de gramíneas. Giacometti *et al.* (2013) y Strecker *et al.* (2015) encontraron esta misma relación en suelos que fueron sometidos a aplicaciones de fertilizaciones inorgánicas, atribuidos por un aumento en la disponibilidad de carbono aportado por la biomasa vegetal y C derivados de las raíces. Geisseler y Horwath (2009) observaron un aumento de la biomasa microbiana relacionado a la mayor cantidad de restos de biomasa vegetal en los suelos, estando de acuerdo con Lange *et al.* (2015) las plantas responderían a la fertilización mineral con un mayor crecimiento de la raíz y la liberación de exudados que no solo proporcionarían más rizodeposición para el crecimiento de los

microrganismo, sino también un entorno de la rizosfera más favorable (Kent y Triplett, 2002; Bais *et al.*, 2006).

Por otro lado, la biomasa aérea vegetal total, muerta en pie y de gramíneas parece incidir decrecientemente sobre el  $qCO_2$ . En forma similar, Strecker *et al.* (2015) observaron una relación inversa del  $qCO_2$  con la biomasa vegetal aérea. Estas relaciones estarían explicadas por las variables que incidieron en la RBS y el C-BM, destacándose la relación del  $qCO_2$  que estaría por una limitación de C dada por la relación C:N del suelo previamente informado (Griffiths *et al.*, 2012). Tanto el C y N pueden ser limitantes para la actividad y crecimiento de la biomasa microbiana, y nuestros datos sugieren que el  $qCO_2$  en los suelos de la estepa en realidad puede estar limitada por el C del suelo (Spohn, 2015).

#### **4. 4. 2. Biomasa vegetal y variables microbiológicas en el ensayo de variación de la precipitación**

Los escenarios de cambio climático en los ecosistemas áridos y semiáridos de Patagonia informan que existirán variaciones en las precipitaciones. Esta variable ambiental incide sobre el ecosistema, lo cual se corroboró con un incremento de la biomasa aérea vegetal total y de gramíneas con el tratamiento de suplementación con riego. Baez *et al.* (2013) y Muldavin *et al.* (2008) han informado esta misma respuesta que se da en la producción de biomasa vegetal cuando se incrementa la humedad del suelo por precipitación en regiones áridas. Un meta-análisis de manipulación experimental de la precipitación ha reportado que la producción de biomasa vegetal aumentó con el aumento de la precipitación (Wu *et al.*, 2011). Por el contrario, si bien la biomasa aérea vegetal tuvo una tendencia a disminuir cuando se redujo la precipitación utilizando las estructuras, las diferencias con el control no fueron significativas. Esto también fue informado en un experimento de largo plazo donde la reducción de la precipitación (50%) no afectó la producción de biomasa (Liu *et al.*, 2018) debido a un efecto compensatorio de las plantas marcado por una plasticidad de las comunidades vegetales y cambios en el componente subterráneo de la biomasa de las raíces. Las estrategias ecológicas y evolutivas del uso del agua por parte de las plantas (Weltzin *et al.*, 2003) en nuestro sitio de estudio y podría estar en línea con una síntesis reciente que sugiere que los experimentos de reducción de precipitación de pocos años rara vez conducen a un cambio en la productividad de las plantas (Estiarte *et al.*, 2016).

La disponibilidad de agua domina la dinámica del crecimiento de las plantas y en consecuencia sobre los microorganismos edáficos en los ecosistemas (Reyer *et al.*, 2013). Las comunidades microbianas responden a través de la resistencia o resiliencia de los microorganismos frente a un estrés ambiental (Allison y Martiny, 2008). En consecuencia, en nuestro estudio se ha observado que el tratamiento sequía no varió el C-BM comparado a la precipitación ambiental natural (control). Esto ha sido informado en otro trabajo que no encontraron una respuesta consistente del efecto de la sequía sobre la biomasa microbiana, la cual dependía del tipo de bioma y de la precipitación media anual de cada sitio (Ren *et al.*, 2017). Según, Geng *et al.* (2015) al evaluar un gradiente experimental de sequía en suelos de climas templados y sus impactos sobre el C-BM, encontraron que en el suelo existe un umbral de sequía definido por un contenido de humedad de cada suelo donde las comunidades de microorganismos no se ven afectadas, dado que hay una adaptación a esa perturbación. El contenido de C-BM bajo las condiciones de estrés hídrico impuestas al no diferir con el tratamiento de precipitación ambiental, supondría que hay una amplitud ecológica de microorganismo tolerante a la sequía para estos ambientes. Es decir, nuestro tratamiento de sequía podría plantearse como un estrés moderado lo cual permite la recuperación de la biota edáfica y su adaptación. Además, en la temporada de crecimiento 2016-2017 con mayor precipitación pudo determinar que la magnitud del efecto entre tratamientos se haya diluido. Ren *et al.* (2017) determinaron en un meta análisis sobre 70 estudios que aumentos de las precipitaciones mejoraron el C-BM en suelos de pastizales y arbustales en ambientes que tenían una precipitación media anual inferior a 600 mm, dados por una mejor difusión de sustratos disponibles que se acompaña con una mayor rotación de la necromasa microbiana que son utilizados para el crecimiento de los microorganismos vivos (Liang *et al.*, 2019). Esto, está en línea con nuestras respuestas en el C-BM donde en estos ecosistemas áridos las precipitaciones no supera los 300 mm anuales (Fig. 4.3), y un aumento de la precipitación en la temporada 2016-2017 mejoró el crecimiento de los microorganismos. Sin embargo, es importante resaltar que en el presente trabajo se determinó un incremento significativo de la biomasa microbiana con una mayor disponibilidad de agua del suelo dada por el riego comparado con el control. En forma similar, Zhao *et al.* (2016) y Bell *et al.* (2014) han encontrado que los tratamientos de manipulación de la precipitación a través de riego estimularon un mayor C-BM. Esto

sugiere que la disponibilidad de agua es un factor abiótico importante que regula el crecimiento de las comunidades microbianas (Liu *et al.*, 2009; Sorensen *et al.*, 2013). Una de las principales limitaciones para la actividad biológica del suelo es la disponibilidad de agua (Collins *et al.*, 2008). Sin embargo, nuestros resultados no encontraron una diferencia en la RBS cuando se manipulo la precipitación ambiental (control) con incrementos o disminución en las precipitaciones que llegan al suelo. Es importante resaltar que las muestras de suelo fueron incubadas con un “pretratamiento” el cual se lo tamiza y acondiciona a una temperatura y humedad controlada (respiración potencial). Estas perturbación podrían seleccionar grupos microbianos en los suelos que dan igual emisión de CO<sub>2</sub> producto de su respiración al permitir mediante el pretratamiento una igualdad en las fracciones orgánicas del suelo que se mineralizan (Kaiser *et al.*, 2015). Un estudio previo, determinó que la respiración heterotrófica (microbiana) es insensible a los cambios en el contenido de humedad del suelo, ya que depende principalmente de la disponibilidad de sustrato que presentan los suelos (C lábiles y fácilmente disponible) y su accesibilidad (materia orgánica físicamente desprotegida y mayor superficie específica del suelo) que son utilizados por los microorganismo para la mineralización de la materia orgánica del suelo (Moinet *et al.*, 2016). Podría suponerse que, el tamizado que se hace al suelo para incubarlo deja a los tratamientos con igual superficie específica y que permite una igualdad de accesibilidad a los microorganismos. Además, parecería que en el corto plazo (2 años de ensayos) no hubo efecto de los tratamientos en estos ecosistemas áridos y templados-fríos que repercutan en cambios en las características del suelo (carbono orgánico), que son utilizados como sustratos respirables por los microorganismos para que varíen la RBS en los suelos de la estepa Patagónica.

La tasa de respiración específica (qCO<sub>2</sub>) mide la eficiencia metabólica de la biomasa microbiana del suelo. Un entorno cambiante crea condiciones que pueden ser estresantes para los microorganismos por lo que deben tener mecanismos de aclimatación para sobrevivir y permanecer activos frente al estrés (Schimel *et al.*, 2007). Nuestros datos describen que el qCO<sub>2</sub> en los tratamientos de perturbación (Riego y Sequía) tuvieron una mayor eficiencia por unidad de biomasa microbiana comparado al control. Estos factores estresante beneficiaron a comunidades tolerantes que pudieron compensar y mantener procesos del ecosistema, como la RBS (Fierer *et al.*, 2003; Williams, 2007), lo cual se confirma con los datos de RBS de

nuestro ensayo que no difirieron entre tratamientos. Sin embargo, las diferencias estuvieron dadas en el C-MB, demostrando que una RBS similar puede ser mantenida por diferentes biomasas de microorganismos. De esta manera, podríamos suponer que el tratamiento control (con mayor  $qCO_2$ ) posee microorganismos que alteraron su asignación de recursos del crecimiento a las vías de supervivencia y/o latencia o permanecen inactivos en el suelo (Brock *et al.*, 1984; Jensen *et al.*, 2003; Schimel *et al.*, 2007). Por otro lado, el tratamiento sequía supondría que parte de esa biomasa fue necromasa microbiana, la cual promovió la liberación de carbono y nutrientes utilizados por otros grupo de microorganismos adaptados a una menor humedad en el suelo. Es decir, los microorganismos usaron esto para su supervivencia, permitiendo el ataque a la materia orgánica del suelo reflejado en la RBS sostenida y acompañado con valores bajos de  $qCO_2$  (Fontaine *et al.*, 2004). También, la adaptación de los microorganismos para la supervivencia se corresponde con la formación de osmolitos, los cuales reducen el potencial hídrico y mantienen la hidratación de sus células (Csonka, 1989), los cuales podrían representar entre el 7 - 20% del total de carbono de la biomasa de bacterias (Killham y Firestone, 1984) y el 10 % en la biomasa celular de los hongos (Tibbett *et al.*, 2002). Al igual que nuestros resultados, otros estudios han informado que la sequía prolongada produce un menor  $qCO_2$  en la población microbiana (Schimel *et al.*, 1999). Aparentemente, los organismos que pueden sobrevivir a la sequía tienen una menor capacidad metabólica, ocurriendo por ejemplo, cambios en la composición de la comunidad microbiana hacia las más tolerantes (Fierer *et al.*, 2003). Por ejemplo, los hongos tienden a ser más tolerantes a la sequía (Harris, 1981) y la sequía tiende a desplazar a la comunidad bacteriana hacia las gram positivas (Uhlířová *et al.*, 2005). Por último, los valores bajos de  $qCO_2$  en el tratamiento riego demuestran una mayor eficiencia de los microorganismos en la utilización de C, favoreciendo el crecimiento microbiano. Esto puede conducir a un mayor secuestro de C por vía microbiana y disminución del potencial de emisiones de  $CO_2$  a la atmosfera, reconocido cada vez más como un mecanismo impulsor para la acumulación de C a largo plazo (Treseder, 2008; Bradford *et al.*, 2013).

Finalmente, el cociente microbiano ( $qM$ ) en nuestro estudio en los suelos del ecosistema de la estepa magallánica seca está en los rangos informados por investigaciones previas (Sparling, 1985, 1992; Mureva y Ward, 2017). Xu *et al.* (2013) en un análisis a nivel global ha informado que los pastizales tienen rangos de cociente



microbiano de 1,95 a 2,23 %. A pesar de ello, nuestros resultados determinaron que el tratamiento con riego tuvo valores más altos de qM comparado con el control. Esto estaría dado por las factores bióticos y abióticos que mejoran el crecimiento microbiano cuando se aumenta la disponibilidad de agua en el suelo, como una mayor disponibilidad de sustrato (Ren *et al.*, 2017) y mayor difusión de los mismos (Zhao *et al.*, 2016), y de manera indirecta por el mayor crecimiento de vegetal que brindan un ambiente rizosférico con mayores exudados de sus raíces (azúcares solubles, aminoácidos) y rizodeposición (Kent y Triplett, 2002; Godley, 2004; Bais *et al.*, 2006). Las variables microbiológicas también presentan interacciones con otros factores. En nuestro estudio se determinó correlaciones positivas entre el agua aportada al suelo, la biomasa vegetal y C-BM. Esto sugiere que la biomasa vegetal y la disponibilidad de agua del suelo fueron determinantes para la comunidad microbiana, lo cual fue confirmado con la regresión lineal positiva entre la producción de materia seca de gramíneas (que a la vez aumenta con la disponibilidad de agua) y C-BM. De igual manera, He *et al.* (1997) han observado que la producción de biomasa vegetal aérea se correlacionó positivamente con el C-BM, resaltando que la biomasa microbiana del suelo sostiene la fertilidad de los suelos en aquellos ambientes donde tienen limitaciones de nutrientes. Por otra parte, Liu *et al.* (2008) encontraron una relación positiva y lineal entre el C-BM y la biomasa vegetal aérea, observando que eso podría acompañarse por una mayor riqueza de especies de plantas. En un estudio *in situ* realizado en suelos de ecosistemas áridos y semiáridos sobre 24 sitios que cubrieron una amplia gama de tipos de biomas, suelos y climas, demostraron que a escala regional la biomasa microbiana del suelo (fúngica, bacteriana y actinomicetos) aumentaron con la precipitación media anual, y su vez estos se relacionaron positivamente con productividad primaria neta aérea anual y biomasa radicular (Chen *et al.*, 2015). Por el contrario, una competencia entre los microorganismos y las plantas determina una relación inversa entre la biomasa vegetal y el C-BM en los ecosistemas, al determinarse que tal competencia es más evidente durante la temporada de mayor crecimiento de las plantas (primavera-verano) (Nie *et al.*, 2015). El C-BM en nuestro estudio fue cuantificado en la estación de otoño cuando el crecimiento de las plantas ha cesado, y la biomasa de las plantas tuvo un efecto positivo en la biomasa microbiana al inmovilizar menos C y N, por lo tanto, una mayor disponibilidad de nutrientes y sustratos en el suelo.

Si bien se detectaron algunas respuestas de la comunidad microbiana al estado hídrico del suelo impuesto por los tratamientos de Drought Net luego de 2 años, es de relevancia continuar el estudio más a largo plazo en el marco de escenarios de cambio climático y las variaciones en la precipitación para los ambientes de la estepa Patagónica.

#### **4.5. CONCLUSIÓN**

Una fertilización más equilibrada de nutrientes (NPK+) aumenta el C-MB, posiblemente debido a mayores restos orgánicos de la biomasa aérea que llega al suelo y exudados de las raíces. En cambio, la RBS en los suelos que fueron fertilizados con N y NPK+ disminuyó. El cociente metabólico ( $qCO_2$ ) parece indicar que la fertilización estimula el crecimiento de microorganismos (mayor C-BM), y favorece el desarrollo de una comunidad microbiana energéticamente más eficiente (menor  $qCO_2$ ). Asimismo, el coeficiente microbiano ( $qM$ ) aumentó con la fertilización de NPK+ lo que parecería de esta manera promover la acumulación de C orgánico en los suelos.

La sequía impuesta como tratamiento no varió el C-BM comparado a la precipitación del sitio (control), lo que hace suponer que hay una amplitud ecológica de los microorganismos a la sequía para estos ambientes. Sin embargo, es importante resaltar que el C-BM aumentó con una mayor disponibilidad de agua del suelo aplicada por el riego, sugiriendo que la disponibilidad de agua es un factor abiótico importante que regula el crecimiento de las comunidades microbianas. En cambio, los tratamientos de sequía y riego no afectaron a la RBS. Los valores bajos de  $qCO_2$  en el tratamiento riego demuestran una mayor eficiencia de los microorganismos en la utilización de C y con valores más altos de  $qM$ . Esto en el futuro podría conducir a un mayor secuestro de C por vía microbiana y una disminución del potencial de emisiones de  $CO_2$  a la atmósfera.

Se debería continuar con ensayos más a largo plazo para confirmar estos resultados, dado que 2 años de ensayos desde la aplicación de los fertilizantes o la imposición de tratamientos de sequía, podrían no ser suficientes en nuestros ambientes áridos y templados-fríos de Patagonia. Ciertamente, parecería que en el corto plazo no existe un efecto de los tratamientos que repercutan en cambios pronunciados en las plantas y en las características del suelo (carbono orgánico), que consecuentemente incidan en las respuestas de los microorganismos del suelo.

## Capítulo 5

### **EFFECTO DE LA FRECUENCIA DE DEFOLIACIÓN SOBRE LAS PLANTAS DE *RYTIDOSPERMA VIRESCENS* Y LA COLONIZACIÓN DE HONGOS MICORRÍCICOS ARBUSCULARES**

## 5.1. INTRODUCCIÓN

Los ecosistemas de pastizales brindan diferentes servicios ecosistémicos (ej., provisión de alimentos, biodiversidad, fertilidad de suelos) para satisfacer las necesidades humanas (Sala y Paruelo, 1997; Costanza *et al.*, 1997; Havstad *et al.*, 2007; Zhao *et al.*, 2020). Las respuestas del pastizal y el crecimiento de las plantas podrían ser influenciados por el tipo de manejo del pastoreo a través de las frecuencias de defoliación (Briske y Richards, 1995; Dawson *et al.*, 2000; Teague *et al.*, 2011; Augustine *et al.*, 2017; Denton *et al.*, 2018). Los establecimientos dedicados a la cría de ganado ovino en Patagonia Sur, mayoritariamente realizan un pastoreo continuo o de veranada-invernada (Golluscio *et al.* 1998; Ormaechea *et al.* 2019). En tanto, el manejo holístico se presenta como otra alternativa de ser aplicada sobre estos pastizales, basado en un manejo rotativo, lo cual permite que la vegetación se recupere con una cierta frecuencia de tiempo hasta que las majadas de ovejas ingresen nuevamente a los cuadros o potreros (Savory y Butterfield, 2016). De esta manera, el pastoreo rotativo proporciona periodos de descanso, donde las plantas y los microorganismos asociados a ellas podrían beneficiar su crecimiento antes del próximo ciclo de pastoreo, mientras que esto no es posible en los sistemas de pastoreo continuo en donde las plantas palatables están sujetas a una probabilidad alta de ser continuamente consumidas (Hart *et al.*, 1993; Briske *et al.*, 2008; Bailey y Brown, 2011). Además, las plantas podrían tolerar intensidades de pastoreos más altas si la frecuencia de defoliación fuera baja. Es por ello, que algunos autores sostienen que es más importante manejar la frecuencia de defoliación, que la intensidad del pastoreo, para mejorar la productividad de las plantas en los ecosistemas (Kothmann, 1984, Savory y Butterfield, 2016).

Se considera que los simbiontes mutualistas, como los hongos MA juegan un papel importante en el funcionamiento de los pastizales de ecosistemas semi-áridos (Barea *et al.*, 2011) al facilitar la absorción de agua y nutrientes del suelo, y aumentar la tolerancia a estrés abiótico como sequía, salinidad o agotamiento de nutrientes minerales (Gianinazzi *et al.*, 2010; Smith y Smith, 2011; Deveautour *et al.*, 2018) y bióticos incluidas las perturbaciones por defoliación y/o remoción de tejido fotosintético a causa del pastoreo (Gehring y Whitham, 2002; Walling y Zabinski, 2006; Barto y Rillig *et al.*, 2010). Mientras varios estudios determinaron que la colonización de MA no fue afectada bajo distintas frecuencias de defoliación (Walling y Zabinski, 2006; Torres *et al.*, 2011; Ambrosino *et al.*, 2020), otros determinaron un aumento o

disminución a mayores frecuencias de remoción de biomasa vegetal en diferentes especies de plantas (Gehring y Whitham 1994, 2002; Allsopp, 1998; Klironomos *et al.*, 2004; Barto y Rillig *et al.*, 2010; Fan *et al.*, 2019). Por lo tanto, esto impactaría en consecuencia sobre la simbiosis de los hongos micorrícicos arbusculares (MA) en los pastizales semiáridos (Barto y Rillig *et al.*, 2010; Barea *et al.*, 2011).

Asimismo, la magnitud de la respuesta de las plantas y los hongos MA a la frecuencia de defoliación podría interactuar con las condiciones ambientales, especialmente en los ecosistemas áridos y semiáridos donde la variabilidad en la precipitaciones y temperaturas resultan ser un factor clave en la estructura y función de estos ecosistemas (Sala, 1988; Golluscio *et al.*, 1998; Austin *et al.*, 2004). Varios trabajos sugieren que la menor humedad del suelo restringiría al crecimiento de las plantas y que indirectamente afectan a la colonización de los hongos MA (Allen *et al.*, 1989; Piippo *et al.*, 2011; Gehring *et al.*, 2017). Además, existen respuestas propias de los hongos MA a la temperatura y la humedad del suelo que influyen en la germinación de las esporas fúngicas, del crecimiento de las hifas, y en la colonización MA de las plantas (Heinemeyer y Fitter, 2004). Este aumento podría ser una respuesta fúngica directa (Heinemeyer y Fitter, 2004, Heinemeyer *et al.*, 2006) o un efecto indirecto a través de un aumento del suministro de carbono de la planta hospedadora, translocado al hongo (Hawkes *et al.*, 2008).

Como se mencionara en la introducción, las MA están presentes en la mayoría de las plantas vasculares (Smith y Read, 2008). Referenciándose que en los pastizales de todo el mundo las especies de plantas anuales, perennes, C<sub>3</sub> o C<sub>4</sub> perteneciente al grupo de plantas de gramíneas forman asociaciones MA en los ecosistemas (Hoeksema *et al.*, 2010; Grman, 2012; Davison *et al.*, 2020), también ha sido confirmado la existencia de la simbiosis MA en especies de plantas pertenecientes a la familia Poaceae para los ecosistemas de la Patagonia Argentina (Fontenla *et al.*, 2001; Cavagnaro *et al.*, 2017, 2019). Algunos estudios informan que las especies de gramíneas presentan un papel facultativo de la simbiosis, como ha sido informado en algunas especies plantas en estudios previos en estos ecosistemas (*Festuca gracillima*, *Deschampsia flexuosa* y *Poa rigidifolia*) (Mendoza *et al.*, 2002; García *et al.*, 2012). Este comportamiento de la simbiosis en las especies de planta ha sido corroborado en el capítulo 3 de la presente tesis para las especies *Poa duseinii* y *Rytidosperma virescens*. En este sentido, la importancia de *R. virescens* se centra al ser una gramínea perenne, presente en el estrato intercoironal de las comunidades

vegetales de las principales áreas ecológicas de Santa Cruz (Borrelli y Oliva, 2001). Además, es una de las especies de preferencia para el consumo de los ovinos en toda la región, al representa en su dieta aproximadamente 8-10 % de participación en la ingesta (Manero *et al.*, 2006; Andrade *et al.*, 2015). Confirmándose que *es una especie* hospedadora de MA en los ambientes de la Patagonia (ver Capítulo 4; Fontenla *et al.* 2001).

En este contexto, el objetivo del presente capítulo fue estudiar el efecto de la defoliación sobre plantas de *R. virescens* y colonización de MA en plantas creciendo en condiciones naturales de campo y bajo condiciones contraladas en invernadero. La hipótesis planteada fue que la colonización de los hongos MA disminuirá a medida que aumentamos las frecuencias de cortes por la remoción de biomasa aérea, independientemente de las condiciones de crecimiento de las plantas.

## 5.2. MATERIALES y MÉTODOS

Para determinar el efecto de distintas frecuencias de defoliación sobre la colonización de MA en plantas de *R. virescens* se establecieron dos ensayos, uno creciendo en condiciones naturales de campo y otro bajo condiciones contraladas en invernadero (Fig.5.1). Las condiciones contrastantes de los dos ensayos permitirían ver las posibles interacciones entre los factores ambientales, temperatura, humedad del suelo y la relación de los microorganismos del suelo y las plantas. En campo se imitan las situaciones propias en estos ecosistemas Australes de Patagonia. Por otro lado el análisis en el invernadero, permite analizar principalmente el efecto de la frecuencia de defoliación, al crecer las plantas en un ambiente con humedad y temperatura controlada, excluyendo las interacciones de los hongos micorrícicos y las raíces de otras plantas.

Para desarrollar los ensayos se eligió un ambiente representativo de los ecosistemas Australes de Patagonia, el cual se caracteriza por ser un sitio con baja actividad antrópica y que cuenta la especie de planta *R. virescens* que es pastoreada por el ganado ovino en esta región. El sitio corresponde a una clausura (2 ha) de más de 25 años sin pastoreo por ganado doméstico (ovino), ubicada dentro de la gran área ecológica Estepa Magallánica Seca (EMS), que pertenece al campo experimental Potrok Aike de INTA (51° 54' 57.7"LS - 70° 24' 26.8" LO). En el Capítulo 4 (sección 4.2) se detallaron las principales características físico-químicas del suelo, cobertura del suelo y tipo de vegetación que describen al sitio. Dentro del sitio de la clausura del

campo Potrok Aike se seleccionaron al azar 140 plantas de *R. virescens*, eligiendo aquellas plantas que tenían un tamaño similar en cuanto a su diámetro de corona a la base y altura de la planta (Tabla 5.1) y que tengan un buen estado sanitario (coloración verde de las hojas, sin manchas necróticas que evidencien síntomas de posibles enfermedades) lo cual caracteriza un buen estado general de las plantas.

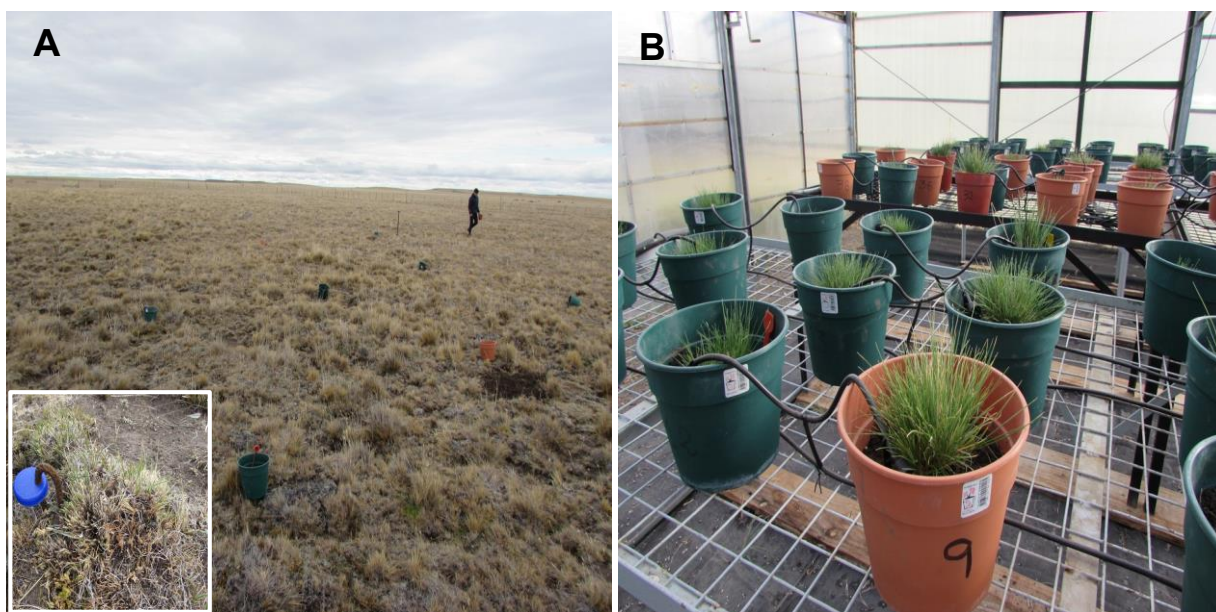
### **5. 2. 1. Ensayo de campo**

Como se mencionó anteriormente, en el sitio corresponde a la clausura (2 ha), ubicada dentro de la gran área ecológica Estepa Magallánica Seca (EMS), se identificaron y seleccionaron 60 plantas de *R. virescens* que estaban distribuidas equidistantes unas de otras (aproximadamente 2 metros), todas las plantas que permanecieron creciendo en campo tenían un tamaño similar en cuanto a su diámetro de corona a la base y altura de la planta. Las plantas fueron identificadas durante todo el ensayo con una varilla metálica con diferentes colores (Fig. 5. 1. A, margen inferior izquierdo) para cada uno de los tratamientos de frecuencia de defoliación, que fueron asignados de manera aleatoria.

### **5. 2. 2. Ensayo de invernadero**

Se montó un ensayo en macetas, del mismo sitio de la clausura, se extrajeron 80 plantas de *R. virescens* de tamaño similar al ensayo de campo con la ayuda de una pala en forma de horquilla, cuidando especialmente no dañar las raíces. Las mismas se colocaron en bolsas de plástico, se humedeció el suelo y se las conservó en un lugar protegidas de las condiciones ambientales (calor, sequía y viento) hasta su trasplante en las macetas en invernadero. Este proceso se realizó en forma inmediata durante las próximas 6 horas (Fig. 5. 2. B). Para mantener las características de suelo del campo en las plantas trasplantadas en las macetas, se utilizó suelo del mismo sitio de la clausura del ensayo de campo. Para ello, se recolectó suelo de los primeros 20 cm de profundidad, el cual fue utilizado para el llenado de las macetas N° 10 (~3 Litros) con una proporción de 4:1 V/V de suelo/perlitas. Una vez trasplantadas, los individuos de *R. virescens* se dejaron durante 15 días en un periodo de adaptación post-trasplante. Este periodo permitió identificar las mejores 60 plantas que presentaron un buen arraigo y establecimiento en las macetas. A partir de este momento, a las plantas en las macetas se les aplicó un riego por goteo que permite la entrega del agua sea más uniforme y que la eficiencia del uso del agua sea mayor. El equipo usado para

este experimento se automatizó por medio de un programador marca Hunter Industries Incorporated modelo X-CORE (California USA). Los riegos programados fueron día por medio, y se aplicaron 3 mm de agua día<sup>-1</sup> aplicados en dos turnos de riego (mañana y tarde) durante los primeros 50 días, y posteriormente se aumentó a 5 mm de agua día<sup>-1</sup> debido al aumento de la demanda por evapotranspiración dentro del invernadero.



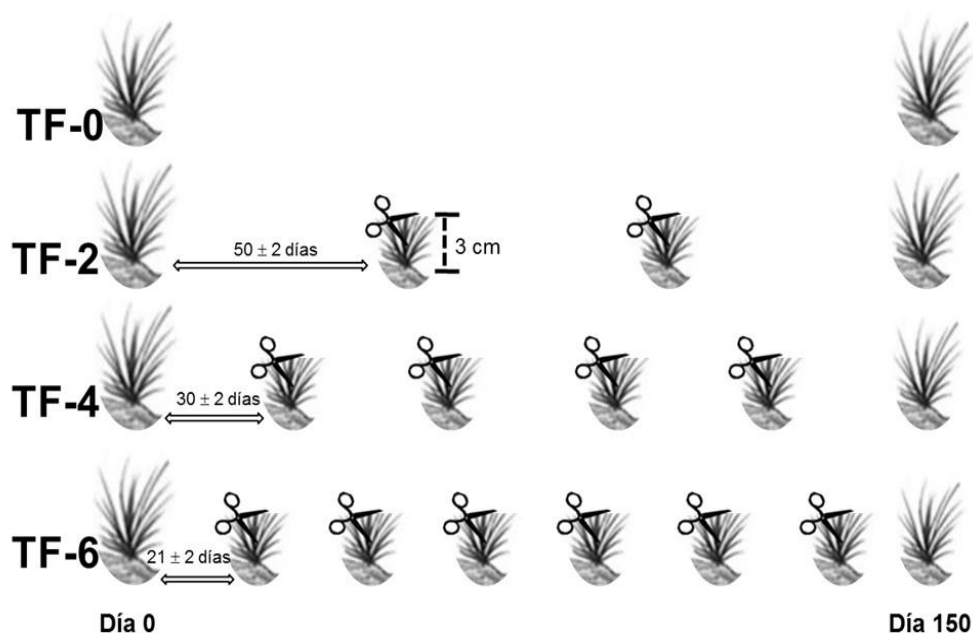
**Fig. 5. 1.** Fotos del ensayo de frecuencia de defoliación en las plantas de *R. virescens* en condiciones A) naturales de campo con plantas identificadas con una varilla metálica (foto inferior izquierda) y B) controladas en invernadero.

### 5. 2. 3. Tratamientos de frecuencia de defoliación

Para ambos ensayos, el periodo de inicio fue el 8 de octubre de 2018, con una duración de 150 días. Este periodo representa la estación de crecimiento para las plantas de la región de Patagonia Austral (Jobbágy y Sala, 2000). Cada ensayo contó con un total de 60 plantas identificadas por tratamientos. Los cuatro tratamientos de frecuencia de defoliación con distintos intervalos entre días de cortes/recuperación fueron: TF-0 = tratamiento control (sin defoliación), TF-2= dos cortes de defoliación con intervalos de 50 días entre cortes, TF-4= cuatro cortes de defoliación con intervalos de 30 días, y TF-6= seis cortes de defoliación con intervalos de 21 días. Cada tratamiento tuvo un total de n=15 individuos. Todos los cortes fueron realizados a una altura de 3 cm desde la base de la corona de las plantas de *R. virescens*, que representa una intensidad de eliminación ~65% de la biomasa aérea (Fig. 5. 2). Esta



altura de corte, permite que los brotes, yemas y meristemas apicales de las plantas no se dañen (Ferrante *et al.*, 2014).



**Fig. 5. 2.** Esquema del ensayo de frecuencia de defoliación utilizado en los ensayos de campo e invernadero. TF-0: tratamiento control, TF-2: dos cortes con intervalos de 50 días de descanso previo al próximo corte, TF-4: cuatro cortes con intervalos de 30 días, y TF-6: seis cortes con intervalos de 21 días a las plantas de *R. virescens*.

#### 5. 2. 4. Características de las plantas seleccionadas y del suelo del sitio EMS para los ensayos

Al inicio de los ensayos, el suelo del sitio de la clausura donde se recolectaron las plantas y que se utilizó para llenado de macetas del ensayo del invernáculo, fue caracterizado físico-químicamente. Para ello se tomaron 3 muestras compuestas al azar de suelo (0-20 cm) que fueron analizados en el laboratorio del INTA-Chubut según protocolos estándares (Tabla 5. 1). Además, para caracterizar las plantas seleccionadas para los ensayos, se tomaron 15 plantas de *R. virescens* al azar del sitio (de tamaño y aspecto similar que las plantas utilizadas en el ensayo de campo e invernadero), lo cual permitió tener una caracterización base de las mismas. A cada planta, se le midió la altura, diámetro de corona a la base, longitud de la raíz, biomasa radical y la biomasa total y la biomasa verde de la parte aérea. También, se cuantifico el estado inicial de la colonización de MA en las raíces de las plantas de *R. virescens* (Tabla 5. 1).

**Tabla 5. 1.** Características del suelo (0-20 cm), descripción de las plantas y estado inicial del grado de colonización micorrízica arbuscular (MA) de *R. virescens* utilizadas al inicio de los ensayos.

Suelo					
Textura	pH	C (%)	N (%)	P (ppm)	K (%)
Franco arenosa	6,5 ± 0,25	3,03 ± 0,38	0,27 ± 0,02	19,5 ± 4,69	0,026 ± 0,003

Planta						
Altura (cm)	DC (cm)	LR (cm)	BR (g MS planta <sup>-1</sup> )	BAT (g MS planta <sup>-1</sup> )	BAV (g MS planta <sup>-1</sup> )	MA (%)
4,9 ± 0,74	3,47 ± 0,79	11,63 ± 0,79	0,58 ± 0,13	2,62 ± 1,09	1,96 ± 0,82	16 ± 4

\*DC: Diámetro de corona a la base; LR: Longitud radical; BR: Biomasa de raíces; BAT: Biomasa aérea total; BAV: Biomasa aérea verde; MA: micorrizas arbusculares.

### 5. 2.5. Mediciones de las características ambientales

Durante todo el período de los ensayos y crecimiento de las plantas de *R. virescens*, se registraron mediciones diarias de las principales variables ambientales. La humedad del suelo fue tomada a una profundidad de 5 a 10 cm utilizando sensores remotos (datalogger marca DECAGON modelo Em5B) instalados en la parcela de la clausura del campo y en las macetas del invernadero. Para el registro de la temperatura del aire y de las precipitaciones durante el periodo del ensayo de campo, se utilizaron los datos de la estación meteorológica del campo experimental de INTA (Potrok-Aike) que está ubicado a 5 km del ensayo. En el ensayo de invernadero los datos de temperatura del aire fueron tomados con datalogger (marca DECAGON, modelo Em5B).

### 5. 2. 6. Mediciones en plantas

En el momento de cada intervención de los cortes a cada tratamiento de ambos ensayos (campo e invernadero) se midió en las plantas individuales identificadas: (i) altura total de las plantas (cm), (ii) diámetro de la corona a la base (DC) (cm), (iii) biomasa área removida en cada corte (BAR) y (iv) biomasa aérea verde (BAV) en los cortes, expresados en (g materia seca (MS)).

Al final del ensayo (desarmado), además de las variables mencionadas anteriormente, se midió (i) longitud de raíces (LR) (cm), (ii) biomasa de raíces (BR) y (iii) biomasa aérea total (BAT) (g MS planta<sup>-1</sup>).

Las biomásas áreas y de raíces de las plantas se determinaron llevando las muestras a estufa a 65 °C hasta peso constante. La biomasa aérea acumulada total verde (BAAV) de las plantas fue calculada como la suma de la BAV al final del ensayo y las

biomasas aéreas removidas en cada uno de los cortes. El incremento de biomasa aérea (IBA) fue calculada dividiendo la BAAV por los 150 días de crecimiento de las plantas, expresando en g MS día<sup>-1</sup>. Por último, el área foliar (AF) total acumulada por cada planta individual (cm<sup>2</sup> planta<sup>-1</sup>) de *R. virescens* se determinó escaneando el total de hojas removidas en los cortes y las hojas de las plantas al final del ensayo. Para esto, las hojas se extendieron al azar sobre un papel blanco y luego se escanearon. El área foliar se determinó utilizando un software de análisis de imágenes (DT-Scan, Delta-T Ltd., Cambridge, Reino Unido).

#### **5. 2. 7. Micorrizas arbusculares**

Las raíces de todas las plantas de campo e invernadero finalizado los ensayos se cortaron y separaron de la parte aérea de la planta (durante las primeras 24 hs). Las raíces se enjuagaron cuidadosamente con agua corriente para limpiar y eliminar restos de suelo y otras partes vegetales. Se controló cuidadosamente que hubiera raíces de otras plantas. Luego, las raíces de cada individuo fueron conservadas y fijadas en alcohol al 70% para su conservación hasta la tinción. Para la cuantificación de la colonización de raíces por micorrizas arbusculares, se utilizaron raíces finas (<2 mm) pertenecientes a los individuos de *R. virescens* de cada uno de los tratamientos de ambas condiciones de cultivo (campo e invernadero). Todas las muestras de raíces se tiñeron usando el método modificado de Phillips y Hayman (1970), (para más detalles, ver Capítulo 4, Sección 4.2.3). Una vez teñidas, las raíces fueron evaluadas bajo microscopio óptico (Olympus BX40). El porcentaje de la raíz colonizada por hongos MA se determinó utilizando el método descrito por McGonigle *et al.* (1990), utilizando microscopio óptico bajo aumento (20X), (detalles ver Capítulo 4, sección 4.2.3). Para ello, se seleccionaron al azar 10 raíces de cada muestra de aproximadamente 1 cm de longitud, las cuales fueron montadas paralelas entre sí sobre un portaobjetos; montándose tres preparados (réplicas de laboratorio, n=3) por cada planta/tratamiento/condición de ensayo recolectada. Esto determinó al menos en 300 campos de observación al microscopio por muestra para estimar la colonización de MA. Las estructuras características de MA (hifas intracelulares o intercelulares, vesículas, rulos (coils) y arbuscúlos (Smith y Read, 2008) fueron utilizadas para determinar campos positivos de colonización de MA. El criterio de confirmación utilizado en este estudio para determinar la ocurrencia de las MA fue la presencia de al menos un arbuscúlos por muestra. Las estructuras típicas de

micorrizas se documentaron tomando imágenes con una cámara digital (Sony ExwaveHAD) e Image-Pro Plus 4.1.0.0. software de análisis para Windows.

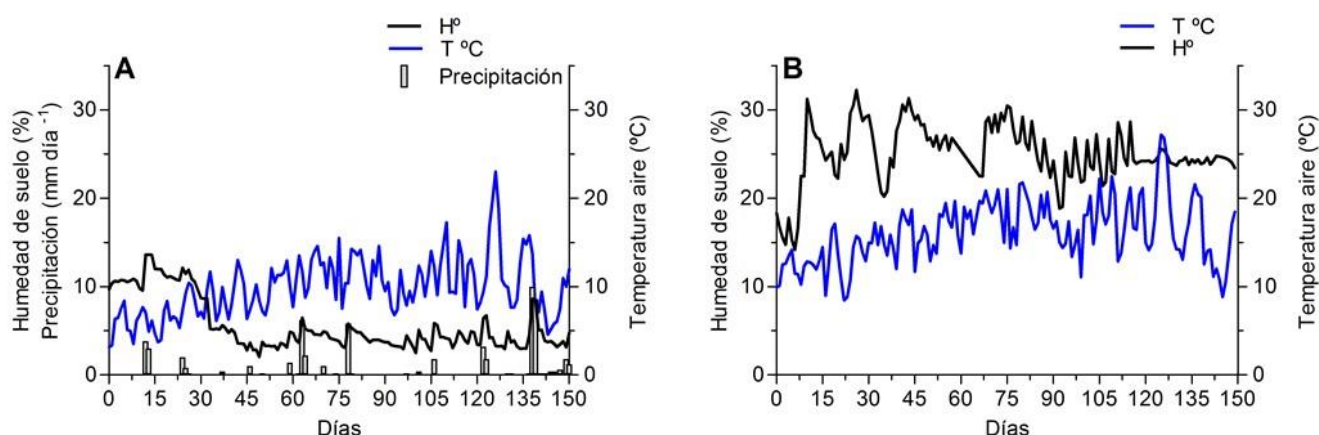
### 5. 2. 8. Análisis estadístico

Los datos fueron analizados utilizando el software INFOSTAT (Di Rienzo *et al.*, 2013). Los datos de las distintas variables de crecimiento de las plantas de *R. virescens*, entre ello: la biomasa aérea total removida (BAR); la biomasa de raíces (BR), la biomasa aérea total acumulada verde (BAAV), el área foliar (AF) y el incremento de biomasa aérea (IBA) fueron analizadas con ANOVA de una vía, evaluando el efecto del factor tratamiento correspondiente a las frecuencias de defoliación con sus 4 niveles del factor (TF-0, TF-2, TF-4 y TF-6) para cada uno de los ensayos de crecimiento de las plantas por separado. Se compararon las variables de crecimiento de las plantas *R. virescens*, biomasa aérea total removida (BAR); la biomasa de raíces (BR), la biomasa aérea total acumulada verde (BAAV), el área foliar (AF) y el incremento de biomasa aérea (IBA), analizando el efecto del factor tratamiento correspondiente a las condiciones de crecimiento de las plantas con sus 2 niveles del factor (campo e invernadero). Los datos de colonización de MA fueron analizados mediante pruebas no paramétricas de Kruskal-Wallis, debido a que no cumplían con los supuestos de normalidad. Se analizó el efecto del factor de tratamiento correspondiente a las frecuencias de defoliación con sus 4 niveles del factor (TF-0, TF-2, TF-4 y TF-6) sobre la colonización de MA en las plantas de *R. virescens* que crecieron en condiciones de campo e invernadero por separados. Se comparó la colonización de MA, analizando el efecto del factor tratamiento correspondiente a las condiciones de crecimiento de las plantas con sus 2 niveles del factor (campo e invernadero). Las diferencias significativas entre las medias fueron analizadas con el test de Tukey con un nivel de significancia de  $p < 0,05$ . Se determinaron los coeficientes de correlación de Pearson obtenidos del análisis entre la colonización de MA y las variables de crecimiento de las plantas de *R. virescens* (BR, BAR, AF e IBA), con una significancia de  $p < 0,05$ ; en estos casos se analizaron los datos de ambos ensayos (campo e invernadero) considerando para ello un total de  $n=120$  individuos. Las variables de colonización de MA, BR, BAR, AF se evaluaron usando regresiones lineales simples. La variable dependiente fue la colonización de los hongos MA y las variables independientes fueron las variables de crecimiento de las plantas de *R. virescens* (BR, BAR y AF).

### 5.3. RESULTADOS

#### 5.3. 1. Temperatura y humedad de suelo registradas para los ensayos

La temperatura del aire en ambas condiciones de crecimiento de las plantas (campo e invernadero) acompañó un aumento continuo desde octubre (día 0) hasta fines de enero. En condiciones naturales de campo la temperatura media diaria del aire fluctuó de 5 a 15 °C, con una humedad del suelo diaria que estuvo por debajo del 10 % la mayor parte del ensayo, con valores entre 2,5 y 9,6 %, excepto los primeros 30 días. La precipitación durante todo el ensayo en el campo fue de ~ 75 mm con pulsos de 0,2 a 9,6 mm/día (Fig. 5. 3. A). En el invernadero la temperatura media diaria fluctuó siempre por encima de los 10 °C, con valores entre 10,2 y 26,7 °C. La humedad del suelo en las macetas de invernadero se mantuvo por encima del 20 % la mayor parte del ensayo, fluctuando de 14,3 a 29,7 % (Fig. 5. 3. B).

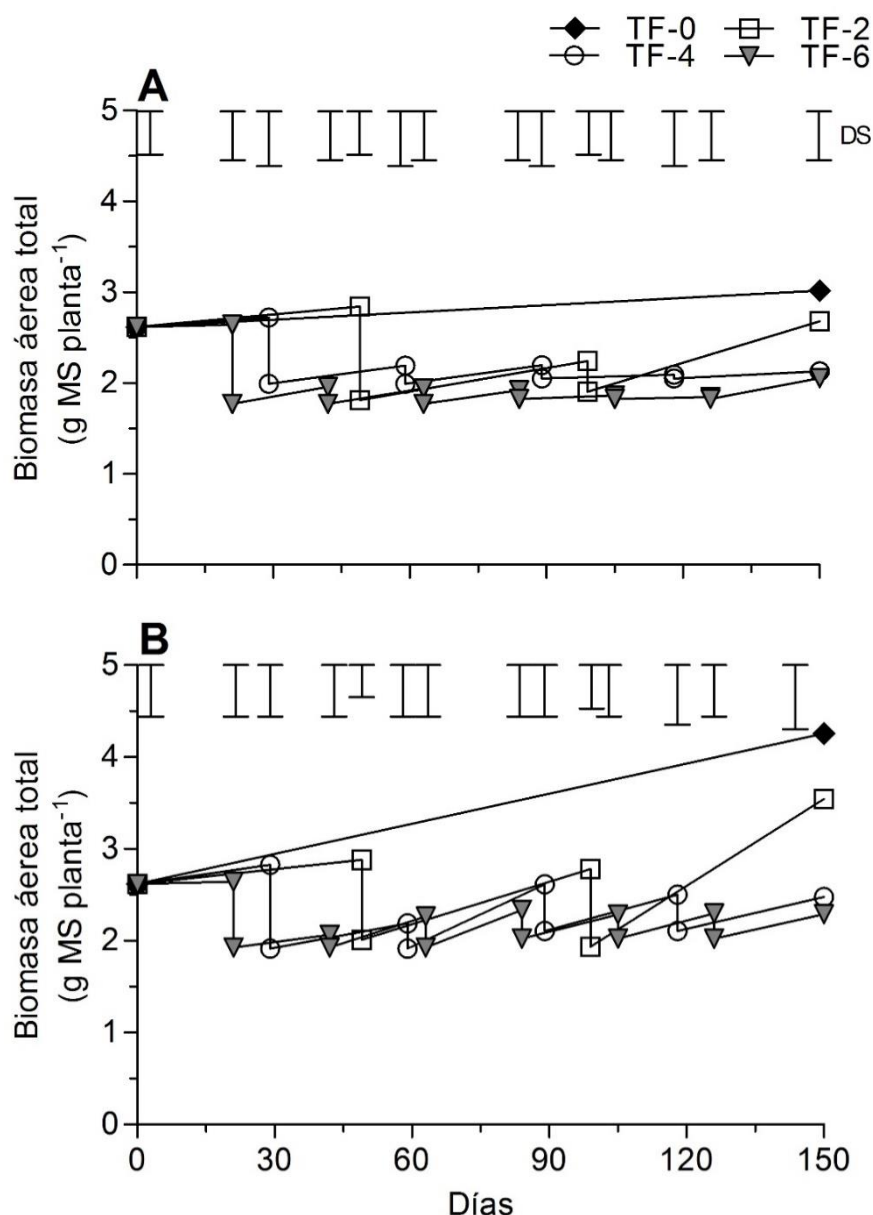


**Fig. 5. 3.** Datos ambientales del ensayo de frecuencia de la defoliación en A) campo y B) invernadero, durante el periodo del ensayo (150 días). (H°) = humedad de suelo (0-5 cm), (T °C) = temperatura media diaria del aire y (II) precipitación diaria registrada en el campo. El día cero corresponde al inicio de los ensayos (8 de octubre 2018).

#### 5.3. 2. Respuesta de las plantas de *R. virescens* a la frecuencia de defoliación

Se puede observar que la dinámica del crecimiento de las plantas, determinaron un mayor crecimiento de biomasa aérea en las plantas de *R. virescens* que crecieron en las condiciones de invernadero respecto a las plantas de campo (Fig. 5. 4). Los tratamientos TF-4 y TF-6 fueron los que menor valor de biomasa aérea en pie tuvieron al finalizar los ensayos. En las plantas del ensayo del campo, se determinó que los tratamientos TF-4 y TF-6 tuvieron poco aumento de biomasa aérea después de realizado los dos primeros cortes de defoliación (Fig. 5.4.A). En cambio, en las plantas de invernadero para los mismos tratamientos se pudo observar que luego de los cortes, siempre existió un crecimiento sostenido (Fig. 5.4.B). Por su parte, las plantas

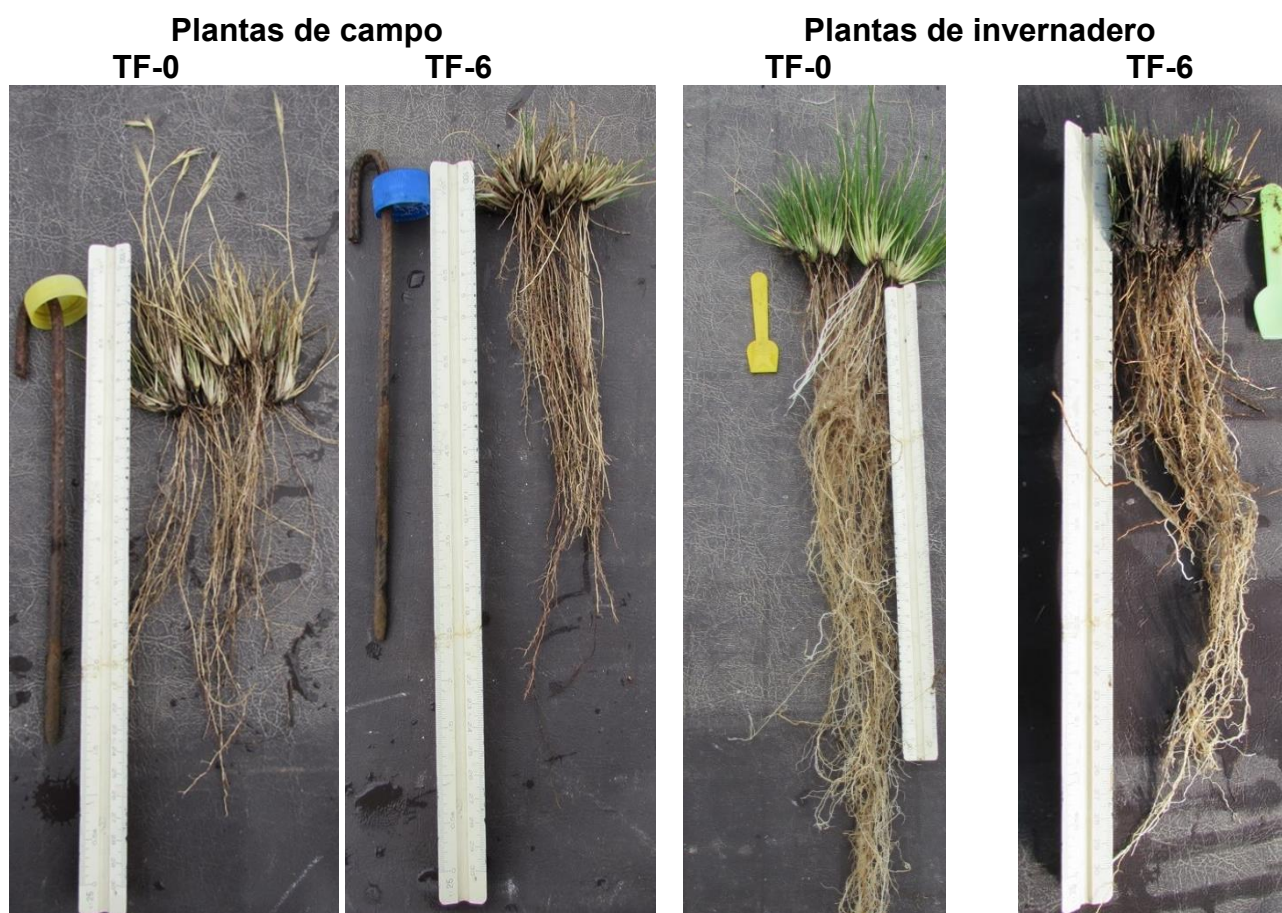
del tratamiento TF-2 en ambos ensayos (campo e invernadero) presentaron un incremento de la biomasa aérea, con valores cercanos al tratamiento TF-0 al final del ensayo.



**Figura 5. 4.** Dinámica de la biomasa área (removida en los cortes y crecimientos posteriores) en plantas de *R. virescens* en campo (A) e invernadero (B) para cada tratamiento (TF-0: tratamiento control, TF-2: dos cortes con intervalos de 50 días, TF-4: cuatro cortes con intervalos de 30 días, y TF-6: seis cortes con intervalos de 21 días). Se muestran las barras de los desvíos estándar (DS) para cada momento de corte y tratamiento con un n=15 individuos de plantas.

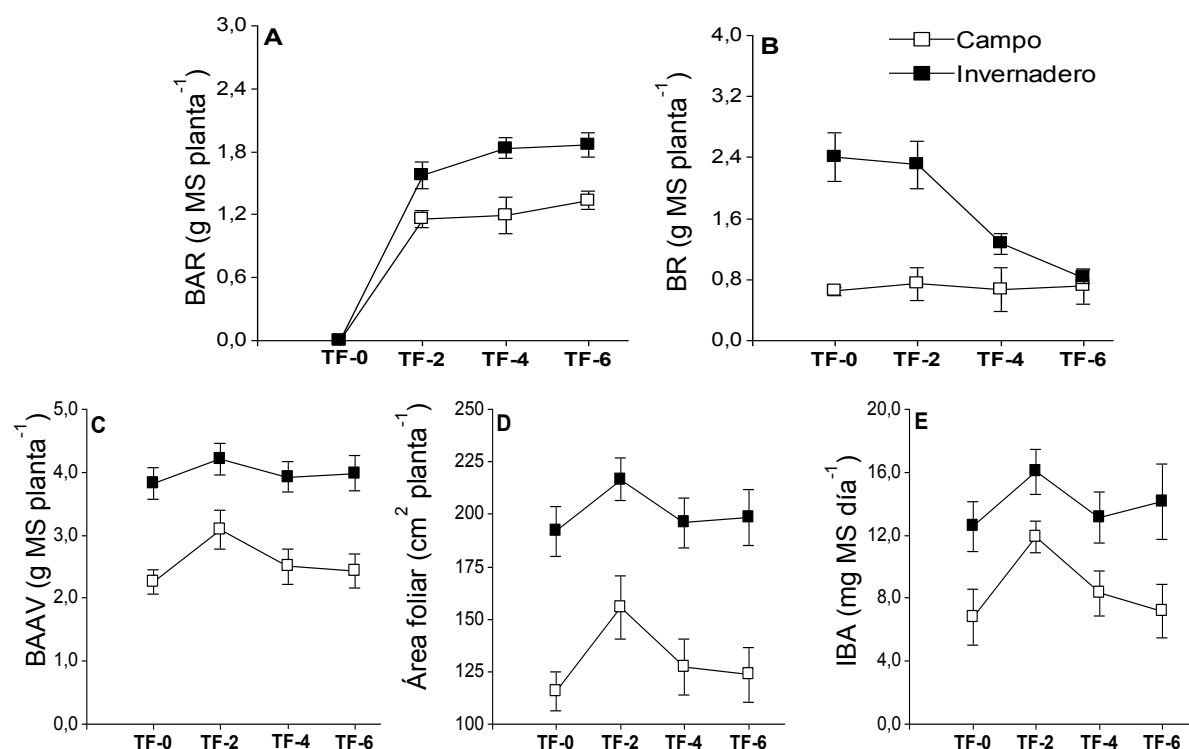
Al final de los ensayos, se determinó los efectos de los tratamientos de frecuencia de defoliación sobre las plantas de *R. virescens* de la parte aérea como subterránea (Fig. 5.5). Los resultados de la BAR mostraron valores superiores en el ensayo de

invernadero comparado con las condiciones de campo (Fig. 5.6. A), pero sin diferencias entre tratamientos de frecuencia de defoliación. La BR en plantas de *R. virescens* para las plantas del ensayo de invernadero tuvieron a los tratamientos TF-0 = TF-2, ambos con valores superiores a los tratamientos TF-4 y TF-6 ( $p < 0,05$ ). En las plantas del ensayo de campo la BR fue similar en todos los tratamientos de frecuencia de defoliación. Los resultados de la BAAV, AF e IBA mostraron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre las condiciones de campo e invernadero para todos los tratamientos de frecuencia de defoliación, con valores superiores en el ensayo de invernadero (Fig. 5.6. C, D, E). La BAAV, AF e IBA entre tratamientos de frecuencia de defoliación para las plantas del ensayo de campo tuvo al tratamiento TF-2 con valores superiores ( $p < 0,05$ ) comparado a los tratamientos TF-0, TF-4 y TF-6. En las plantas del ensayo de invernadero la BAAV, AF e IBA fue similar en todos los tratamientos de frecuencia de defoliación.



**Fig. 5. 5.** Individuos de *R. virescens* de los ensayos de en condiciones naturales de crecimiento y bajo condiciones controladas en invernadero. Visualización de las partes áreas y subterráneas que se contrastan para los tratamientos TF-0 = (control) y TF-6 = correspondiente al tratamiento de seis cortes con intervalos de 21 días entre cortes.





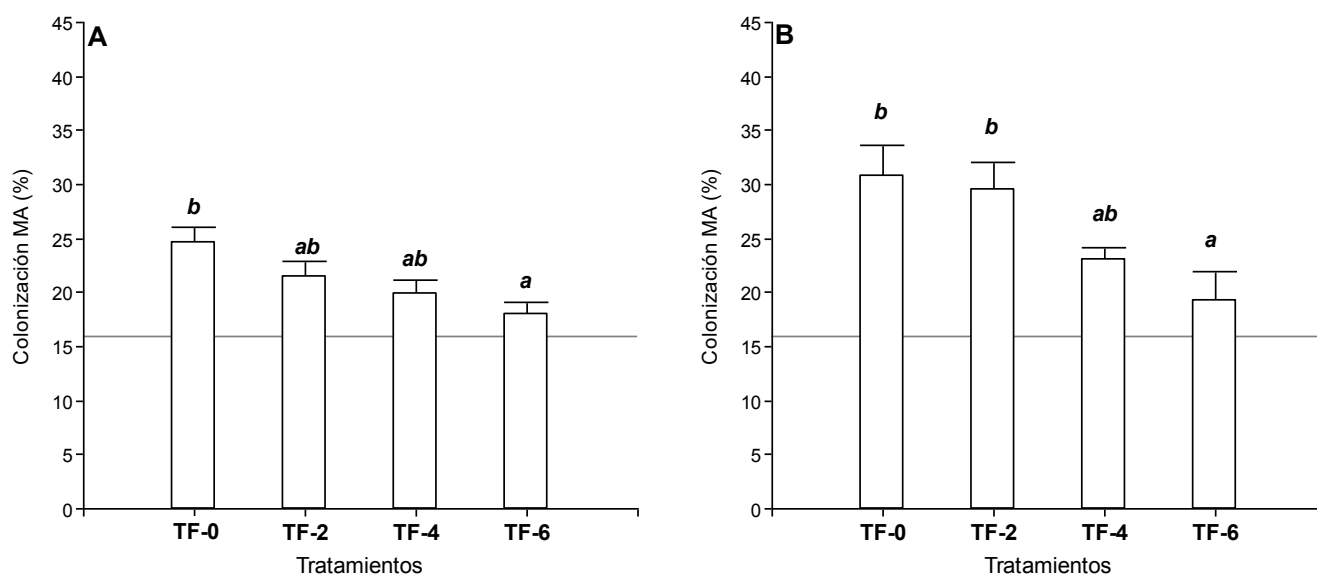
**Fig. 5. 6.** Variables de crecimiento de *R. virescens* de los ensayos de frecuencia de defoliación luego de 150 días, campo (cuadrados vacíos) e invernadero (cuadrados solidos negros) para los cuatro tratamientos (TF-0: tratamiento control, TF-2: dos cortes con intervalos de 50 días, TF-4: cuatro cortes con intervalos de 30 días, y TF-6: seis cortes con intervalos de 21 días). A) BAR: Biomasa aérea total removida; B) BR: Biomasa de raíces; C) BAAV: Biomasa aérea total acumulada verde, D) Área foliar; y E) IBA: Incremento de biomasa aérea verde.

### 5.3. 3. Micorrizas arbusculares y la defoliación en las plantas de *R. virescens*

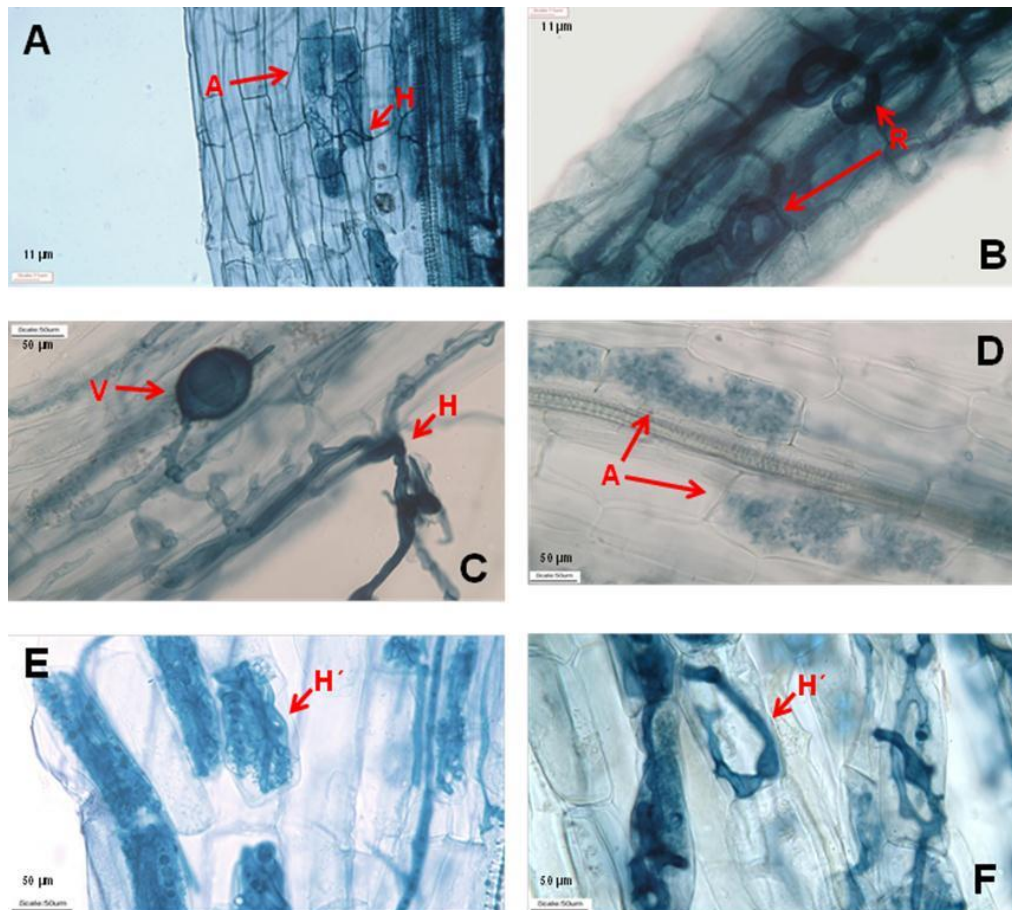
La valores de colonización de MA en las plantas de *R. virescens* al finalizar el ensayo en general fueron mayores en aquellas plantas que crecieron en condiciones controladas de invernadero  $27 (\pm 9) \%$  que en campo y  $21 (\pm 5)$ , respectivamente. Los valores de MA en las plantas al finalizar el ensayo en los distintos tratamientos de frecuencia de defoliación arrojaron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre tratamientos, para cada una de las condiciones de crecimiento de cultivo (Fig. 5. 7). En el ensayo de campo, el tratamiento TF-6 que tuvo una mayor frecuencia de defoliación, los valores de colonización de hongos MA fueron menores (25 %) significativamente ( $p < 0,05$ ) respecto al TF-0 (18 %) (Fig. 5. 7. A) y los otros tratamientos tomaron valores intermedios TF-2 (21 %) y TF-4 (20 %) sin diferencias estadísticas. En el ensayo de invernadero, la colonización de MA fue similar entre los tratamientos TF-0 (31 %) y TF-2 (30 %), con una tendencia a disminuir a medida que aumentó la frecuencia de defoliación, siendo el valor de colonización de MA en las



plantas de *R. virescens* del tratamiento TF-6 significativamente ( $p < 0,05$ ) menor (19 %) que los tratamientos TF-0 y TF-2 (Fig. 5. 7. B).



**Fig. 5. 7.** Micorrizas arbusculares (MA) en los ensayos de frecuencia de defoliación de las plantas de *R. virescens* creciendo en A) campo y B) invernadero. Los tratamientos de frecuencia de defoliación corresponden: TF-0 (tratamiento control), TF-2 (dos cortes con intervalos de 50 días), TF-4 (cuatro cortes con intervalos de 30 días), y TF-6 (seis cortes con intervalos de 21 días). Se muestran los valores medios de MA y las barras con los desvíos estándar. Letras minúsculas distintas indican significancia estadística ( $p < 0,05$ ) entre los tratamientos en cada uno de los ensayos. (—) la línea representa la colonización de las plantas de *R. virescens* al inicio del ensayo, determinada para la caracterización inicial del sitio donde se recolectaron las muestras.



**Fig 5. 8.** Estructuras microscópicas intraradicales de los hongos MA en las plantas de *R. virescens* del ensayo de frecuencia de defoliación. Fotos microscópicas en (A) TF-0 de invernadero, (B) TF-0 en campo, (C) TF-4 de campo, (D) TF-2 de invernadero y (E y F) TF-6 en invernadero y campo, respectivamente. Se identifican con flechas las estructuras de los hongos MA como: (H) hifas intraradicales, (R) rulos-coils, (V) vesículas, (A) arbusculos y (H') parecen ser hifas que se están reabsorbiendo dentro de las células de la raíz de la planta. Escalas de 11 µm (A, B) y de 50 µm (C, D, E, F).

#### 5.3.4. Relación entre la micorrización MA y las variables de crecimiento de las plantas de *R. virescens*

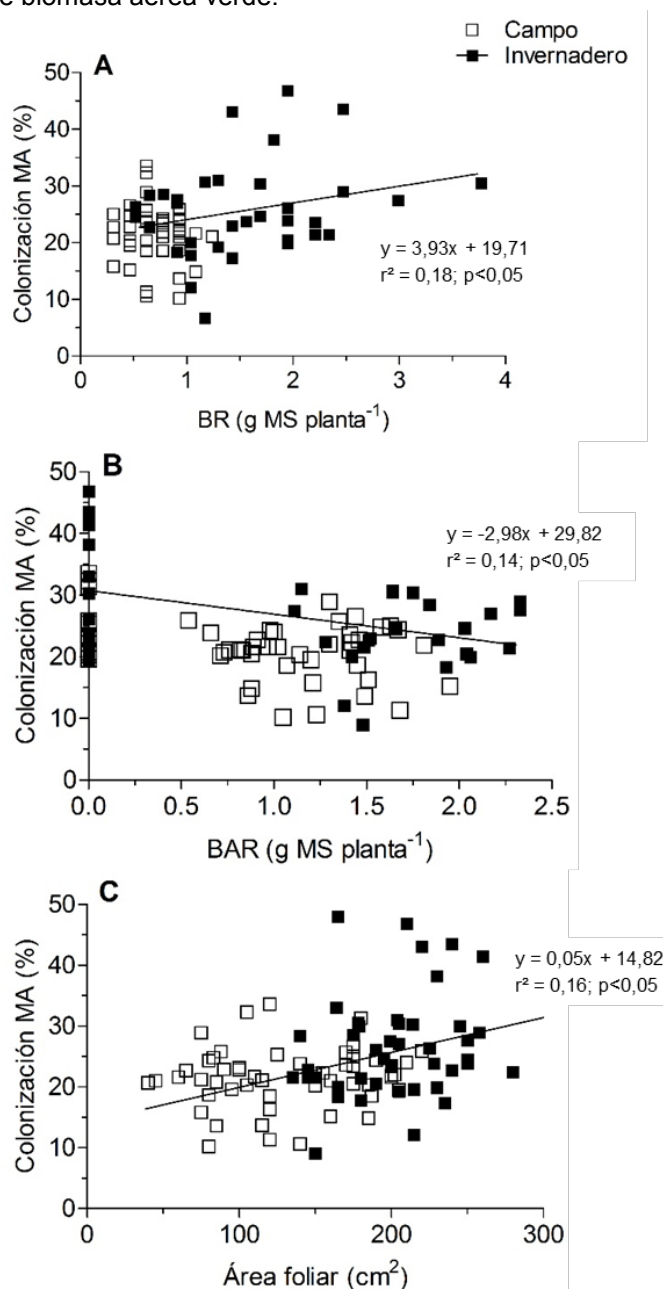
Los resultados del coeficiente de correlación de Pearson mostraron una correlación negativa y significativa entre la colonización de hongos MA y la biomasa aérea removida (BAR) (Tabla 5. 2). En contraste, la biomasa de raíces (BR) y el área foliar (AF) tuvieron una correlación positiva con la colonización de MA en las plantas de *R. virescens*. Entre la colonización de MA y el incremento de biomasa área (IBA) no se observó correlación (Tabla 5. 2). Los análisis de regresión lineal simple determinaron una relación lineal negativa entre la colonización de hongos MA y la biomasa aérea removida (BAR) y ( $p < 0,05$ ) (Fig. 5.9. B). En cambio, la colonización MA tuvo una

relación positiva con las variables biomasa de raíces (BR) y el área foliar (AF) de las plantas de *R. virescens* (Fig. 5. 9. A, C).

**Tabla 5. 2.** Correlaciones entre la colonización de MA y las variables de crecimiento de las plantas de *R. virescens*. Considerando todas las plantas (n=120) de los ensayos de campo e invernadero.

Variables de plantas	Pearson	p-valor
BR (g MS planta <sup>-1</sup> )	0,43	0,0003
BAR (g MS planta <sup>-1</sup> )	-0,25	0,0188
ÁF (cm <sup>2</sup> )	0,25	0,0130
IBA (mg MS planta <sup>-1</sup> )	0,11	0,3388

BR: Biomasa de raíces; BAR: Biomasa aérea total removida; AF: Área foliar e IBA: Incremento de biomasa aérea verde.



**Fig. 5. 9.** Relación de la micorrización MA con la biomasa aérea total removida (BAR), la biomasa de raíces (BR) y área foliar (AF) de las plantas de *R. virescens* en los ensayos de frecuencia de defoliación de las plantas de campo e invernadero.

## 5.4. DISCUSIÓN

### 5.4.1. Respuestas de las plantas a la frecuencia de defoliación

Los pastizales han sido estudiados a nivel global por ser uno de los ecosistemas con mayor relevancia para la productividad ganadera en los ambientes de pastizales de Estados Unidos, Australia y China (Havstad *et al.*, 2007; Eldridge *et al.*, 2016; Fan *et al.*, 2019). Los pastizales de los ambientes semiáridos están sujetos a una fuerte variación interanual en la precipitación y, por lo tanto, tienen una dinámica en la producción primaria de las plantas dependiente de las condiciones climáticas interanuales, entre ellas las temperaturas y precipitaciones (Sala *et al.*, 1992; Golluscio *et al.*, 1998). Para poder captar y analizar la variabilidad de las condiciones ambientales (temperatura y precipitación), las plantas sujetas a los tratamientos de frecuencia de defoliación, se evaluaron en el presente estudio en ensayos con dos condiciones de crecimiento de cultivo contrastantes: en campo con temperaturas y humedad del suelo limitantes, y plantas en invernadero con temperaturas y humedad del suelo cercano a condiciones óptimas de crecimiento como se ha informado en otro estudio para 9 especies de plantas perteneciente al mismo género *Rytidosperma spp.* de los ecosistemas de Australia (Waddell *et al.*, 2017). (Fig. 5. 3). Las plantas de *R. virescens*, que se desarrollaron en el invernáculo al final de la temporada de crecimiento (marzo) presentaron, en general, incrementos en el crecimiento de las plantas tanto aéreo como subterráneo, con valores de biomasa aérea vegetal total de las plantas sin defoliación (control) que tuvieron aproximadamente de 3 y 4 g MS planta<sup>-1</sup> en las condiciones de campo e invernadero, respectivamente. Esto posiblemente debido a la humedad del suelo, registrándose en invernadero valores aproximados 20 % que fueron superiores a los de campo < 10 %. Generalmente, los incrementos de la humedad del suelo repercute directamente en una mayor disponibilidad para la actividad biológica de los microorganismos del suelo asociados a las plantas y, en la absorción de nutrientes y agua por parte de las plantas, que mejoran su crecimiento (Austin *et al.*, 2004; Piippo *et al.*, 2011; Gehring *et al.*, 2017). Coronato y Bertiller (1996) han reportado que en los ambientes de Patagonia, la mayor humedad del suelo, debido a las precipitaciones influye directamente en crecimiento de las plantas, dado que son las precipitaciones las que recargan los perfiles del suelo y mantiene la humedad del suelo inclusive con pulsos tan bajos de lluvias inferiores a los 10 mm.

Se podría suponer que las plantas de invernadero tuvieron acceso a mejores recursos de agua disponibles en el suelo y a temperaturas superiores la mayor parte del tiempo (en invernadero los varió entre 10,2 y 26,7 °C, mientras que en campo entre 5 a 15 °C) lo cual podría estimular un aumento de su biomasa vegetal. Esto ha sido confirmado en otros estudios, en los cuales la disponibilidad de agua junto con la temperatura fueron los principales factores que regularon el crecimiento de plantas en pastizales áridos y semiáridos (Schwinning *et al.*, 2005). Heisler-White *et al.* (2008) han informado que los pastizales semiáridos son capaces de responder rápidamente a los cambios de los patrones de precipitación debido a la adaptación ecológica que tiene algunas especies de gramíneas de los ambientes áridos para responder rápidamente a eventos pequeños, menores a 5 mm de lluvia (Lauenroth y Sala, 1982). La biomasa vegetal de las plantas y el área foliar fue menor en las plantas que crecieron en campo comparado a las plantas del invernadero. Sun *et al.* (2017) determinaron que el área foliar se reduce en condiciones de menor humedad del suelo, planteando que esto es una forma de que tienen las plantas para mejorar la eficiencia en el uso del agua, coincidente también con los datos informados en otro trabajo por Tardieu *et al.* (1999). La mayor área foliar que mostraron las plantas de invernadero determinaría una mayor capacidad fotosintética que beneficia al crecimiento de las plantas cuando los recursos de agua y temperaturas no son limitantes. Del mismo modo en este ensayo, la biomasa de las raíces de las plantas sin defoliar (control) fue menor en las condiciones de menor humedad del suelo registradas en el campo, que en las del invernadero. Flemmer *et al.* (2002) demostraron en plantas perennes C<sub>3</sub> (*Stipa clarazii*, *S. tenuis* y *S. gynerioides*) de los pastizales del centro de Argentina, el crecimiento de las raíces se redujeron a medida que la humedad del suelo disminuyó.

Las prácticas de manejo del pastoreo son consideradas herramientas claves para mantener las funciones de los pastizales y la sostenibilidad de estos ecosistemas (Augustine *et al.*, 2017; Porensky *et al.*, 2017). Briske *et al.* (2008) y Savory y Butterfield (2016) plantean que el pastoreo rotativo proporciona periodos de descanso donde las plantas podrían recuperarse antes del próximo ciclo de pastoreo, en donde la frecuencia de defoliación afectaría las respuestas del crecimiento de las plantas. Denton *et al.* (2018) en un ensayo realizado bajo condiciones controladas sobre dos especies nativas de gramíneas perennes (*Psuedoroegneria spicata* y *Poa secunda*) y una exótica (*Agropyron cristatum*) representativas de los ecosistemas áridos del Norte

de Estados Unidos, encontraron que la defoliación frecuente de alta intensidad (70% de remoción del tejido foliar, durante 4 meses de ensayo) causó reducciones en el crecimiento de raíces y en el número de macollos en todas las especies, en comparación con las plantas no defoliadas. En el ensayo de campo del presente estudio, la biomasa de las raíces no se modificó por los tratamientos de frecuencia de defoliación, sin embargo en el invernadero se vio afectada, reduciéndose con la mayor frecuencia de defoliación. Algunos estudios han informado que la defoliación frecuente reduce la biomasa de las raíces en especies de gramíneas perenne (Holland *et al.*, 1996; Flemmer *et al.*, 2002; Garrido *et al.*, 2010). De manera similar, en otro estudio ha sido demostrado que la frecuencia de defoliación afecta el crecimiento de las plantas perennes en los ecosistemas de pastizales, impactando en la producción de nuevos brotes y el crecimiento del sistema radicular (Briske y Richards, 1995). Nuestros datos en invernáculo muestran que la biomasa área acumulada (biomasa en pie + removida por defoliación) y el área foliar de *R. virescens* sometidas a distintas frecuencias de defoliación tuvieron una tendencia a valores similares entre los tratamientos de remoción de tejido foliar. Esto indicaría que las plantas siguieron creciendo en su parte aérea con aparición de nuevas hojas y brotes a pesar de la remoción de biomasa vegetal por la defoliación, y cuantificados en la biomasa área removida (Fig. 5.4). Este crecimiento parecería ser a expensas del sistema de raíces de las plantas en aquellos tratamientos de mayor frecuencia de defoliación (TF-4 y TF-6), demostrando indirectamente la importancia del traslocamiento de los fotosintatos desde las hojas para el mantenimiento y crecimiento radicular. Garrido *et al.* (2010) encontraron que las plantas bajo el tratamiento de defoliación tenían un 30% más de área foliar que las plantas no defoliadas como resultado de una mayor producción de hojas en comparación con las no defoliadas, lo que sugiere una compensación por la pérdida de área foliar. Esto fue demostrado en el presente estudio en el tratamiento TF-2 para las plantas de campo que aumentaron el AF. Peri *et al.* (2003) informan que el AF es utilizado como un parámetro relacionado al tamaño de las plantas, tasa de crecimiento, la fotosíntesis y la absorción de nutrientes. Briske y Richards (1995) mostraron que el crecimiento y el funcionamiento de las raíces dependen de la energía proporcionada por la fotosíntesis. Por lo tanto, este proceso se vería interrumpido en las plantas sometidas al tratamiento de menor intervalo de descanso entre cortes (TF-6), ya que la capacidad potencial de reemplazo del área foliar está determinada por el número y la actividad fisiológica de los meristemas

apicales e intercalares que quedan después de un evento de defoliación (Briske y Richards, 1995). Esta limitación del crecimiento de las raíces (plantas de campo) o reducción del desarrollo radicular (plantas de invernadero) por remoción de la biomasa aérea puede tener un efecto en el desarrollo de las plantas a largo plazo. Gehring *et al.* (2017) sugieren que cuando se restringe o reduce la biomasa de raíces esto impactaría de manera directa en el crecimiento de las plantas por disminuir las funciones asociadas al sistema de raíces que se relacionan con la absorción de nutrientes y agua del suelo al tener una menor capacidad de exploración en el ambiente edáfico. En efecto, una remoción de biomasa vegetal a las plantas de *R. virescens* con intervalos entre cortes que fueron > 50 días (tratamiento TF-2) plantea una respuesta interesante sobre la especie y su interacción con las frecuencias de defoliación que podrían realizarse con los diferentes manejos cuando se aplica un sistema de pastoreo rotativo para el manejo del pastizal. Es decir, este periodo de recuperación parecería generar en la planta, tanto de campo como en invernadero, una mejora para el crecimiento aéreo como subterráneo y consecuentemente en la colonización de hongos MA.

#### **5.4.2. Efecto de la frecuencia de defoliación sobre las micorrizas**

Los hongos micorrícicos arbusculares (MA) juegan un papel importante en el funcionamiento y la sostenibilidad de los agroecosistemas (Smith y Read, 2008; Tedersoo *et al.*, 2020). Las plantas y su interacción con los microorganismos (incluyendo los hongos MA) pueden ser afectadas por la intensidad y frecuencia del pastoreo (Ferraro y Oosterheld, 2002; Barto y Rillig *et al.*, 2010; van der Heyde *et al.* 2017) ya que podría limitar el carbono de los fotosintatos que las plantas traslocan a las raíces y que son utilizados por los hongos micorrícicos (Gehring y Whitham 1994, 2002; Barto y Rillig *et al.*, 2010). La frecuencia de defoliación como tratamiento sobre las plantas de *R. virescens* en el presente estudio, están relacionadas con las prácticas de manejo del pastizal que son realizadas en los distintos establecimientos ganaderos de la provincia de Santa Cruz (Ormaechea *et al.*, 2019), donde, por ejemplo, el tratamiento TF-6 simularía al pastoreo continuo y los tratamientos TF-2 y TF-4 intentan representar un sistema de pastoreo rotativo, que difieren en los intervalos entre pastoreo. En nuestro ensayo sobre la especie *R. virescens*, pudimos demostrar que el efecto del pastoreo simulado intenso ~ 65 % de remoción vegetal, impactó de manera negativa sobre la colonización de hongos MA, así mismo los

valores de colonización dependieron (correlación negativa) de la frecuencia de la defoliación a las que las plantas fueron sometidas. Considerando sólo los resultados del ensayo de invernáculo (plantas creciendo sin limitación de recursos), el tratamiento de menor frecuencia de defoliación (TF-2) con intervalos de descanso entre cortes mayores a 50 días, la colonización MA en raíces no se modificó, mostrando valores similares al tratamiento control (sin defoliación). Sin embargo, cuando la frecuencia de defoliación fue la mayor (TF-6), con solo 21 días de recuperación para las plantas en invernadero, la colonización disminuyó significativamente respecto a las plantas no defoliadas. Allsopp (1998) encontró que los tratamientos de frecuencia de la defoliación con intervalos entre cortes < 30 días en sus experimentos realizados sobre las especies *Digitaria eriantha*, *Lolium perenne* y *Themeda triandra* disminuyó la colonización de hongos MA. Saito *et al.* (2004) investigaron los efectos de varias frecuencias de la defoliación sobre las asociaciones de MA en los pastizales, y observaron una disminución de la colonización de hongos MA en la especie *Miscanthus sinensis*. En cambio, Walling y Zabinski (2006) en su estudio sobre dos gramíneas nativas representativas de los pastizales del Oeste de los Estados Unidos (*Festuca idahoensis* y *Pseudoroegneria spicata*), evidenció que la defoliación no afectó la colonización de MA al cortar las plantas solo una vez en los 100 días que duró su ensayo. Del mismo modo, Torres *et al.* (2011) observaron que la colonización no era afectada por la defoliación en varios genotipos de gramíneas nativas (*Pappophorum vaginatum*, *Aristida subulata*, *A. spengazzinii*, *Sporobolus cryptandrus*) y exóticas (*Leymus cinereus*, *Achnatherum hymenoides*, *Eragrostis curvula*) en ecosistemas del Norte Patagónico aplicando solo dos cortes durante toda la estación de crecimiento primavera-verano. Posiblemente, la falta de respuesta encontrada en esos estudios, y que difieren con los resultados del presente trabajo, estén dadas por la baja frecuencia de defoliación que aplicaron en sus tratamientos. Torres *et al.* (2011) plantean que, es probable que las respuestas de las micorrizas a la pérdida de tejidos fotosintéticos pueden ser a corto plazo, y los niveles de colonización volverían a los valores del control (plantas sin defoliación) al generar nueva producción de biomasa vegetal. Es necesario considerar la probabilidad de esta respuesta a corto plazo en estos simbioses MA, una asociación estable que tiene desarrollo extraradical en el suelo, independientemente de si baja su colonización por poco tiempo o no, parecería ser la colonización MA un factor importante a considerar respecto de los intervalos entre las frecuencias de defoliación, para que la planta no afecte a la simbiosis MA.



Van der Hayde *et al.* (2017) encontraron que las diferencias en los hongos MA entre plantas defoliadas versus plantas no defoliadas son estrictamente dependiente del tiempo de descanso y/o recuperación. Otro aspecto sobre las respuestas de la simbiosis MA al pastoreo consiste en considerar que las especies de hongos MA pueden diferir en sus demandas de carbono (Saikkonen *et al.*, 1999) relacionado a sus diferentes estrategias de crecimiento (Hart y Reader, 2002) o debido a la sensibilidad diferencial que pueden presentar los hongos MA relacionados al estrés fotosintético causado por la defoliación en las plantas (Bethlenfalvay y Dakessian, 1984). Algunos estudios informan que las especies de hongos MA de los géneros *Glomus* y *Rhizophagus*, comunes en ambientes áridos y semiáridos, toleran niveles más bajos de carbohidratos provenientes de las plantas hospedadoras (Barto y Rillig, 2010; Yang *et al.*, 2013). Klironomos *et al.* (2004) de manera similar al presente estudio, determinaron que una frecuencia de defoliación entre cortes de 7 y 21 días en plantas de *Bromus inermis* disminuyeron la colonización de las distintas estructuras de los hongos MA (vesículas, hifas y arbúsculos). Fan *et al.* (2019) en un experimento con tres niveles de defoliación (control, cortes cada 3 semanas y semanalmente) sobre plantas de *Lolium rigidum* que crecieron 4 meses en el invernadero, encontraron una disminución de la colonización MA. La colonización de los hongos MA y las respuestas encontradas en los tratamientos de frecuencia de defoliación impuestos en este ensayo sobre la especie de planta *R. virescens*, podrían sugerir (especialmente en el tratamiento más severo TF-6) que la disminución en biomasa está relacionada a una limitación del carbono necesario para el desarrollo del simbionte. A su vez podría ser un factor limitante para el desarrollo del ecosistema, si persiste el tipo y magnitud de la defoliación, al no permitirle a la planta recuperar tejido fotosintético. Esto estaría en consonancia con la hipótesis de la limitación del C para la simbiosis entre las plantas-hongos MA que fue postulada en estudios anteriores por Gehring y Whitham (1994, 2002).

#### **5. 4. 3. Efecto de la frecuencia de defoliación interactuando con el ambiente sobre las micorrizas**

En el presente estudio se pudo determinar cómo las condiciones de crecimiento de las plantas *R. virescens*, tuvieron un efecto sobre la simbiosis MA. Es decir, las condiciones favorables en las plantas creciendo en invernadero (mayor humedad del suelo y temperatura del aire) determinaron mayor colonización de MA respecto a las plantas del campo (Fig. 5.7). De manera similar, Allen *et al.* (1989) en las especies

*Agropyron desertorum* y *A. spicatum* determinaron que el aumento de la humedad del suelo tendió a aumentar el crecimiento de las raíces y la colonización por MA. La humedad del suelo es un factor que restringe el crecimiento de las raíces, se ha demostrado que impacta indirectamente en la reducción de la colonización por los hongos MA (Gehring *et al.*, 2017; Sun *et al.*, 2017). En el presente estudio, las tasas de colonización MA en las plantas de campo fueron todas más bajas que las de las plantas en condiciones de invernadero. La sequía (menor humedad en el suelo) induce el cierre de estomas, fotosíntesis reducida, asimilación alterada y disminución del crecimiento de las plantas, lo que podría resultar en una reducción de fotosintatos y en la cantidad de exudados para la raíz, lo que a su vez reduciría la colonización de MA (Fagbola *et al.*, 2001, Lehto y Zwiazek, 2011). Además, la escasez de agua en el suelo puede reducir y/o retrasar la germinación de esporas fúngicas de MA y, por lo tanto, el desarrollo de micorrizas (Al-Karaki *et al.*, 2004). Por otra parte, las mejores condiciones de temperatura en el invernadero (valor medio del periodo evaluado 16 °C) respecto a las plantas *R. virescens* del campo (promedio de 9 °C) pudo ser otra variable que indujo cambios en las plantas y los hongos simbioses MA. Varios estudios informaron un aumento de la colonización de MA en condiciones de temperaturas más cálidas (Heinemeyer y Fitter, 2004; Kytoviita y Ruotsalainen, 2007). Este aumento podría ser una respuesta fúngica directa (Heinemeyer y Fitter, 2004, Heinemeyer *et al.*, 2006) o un efecto indirecto a través de un aumento del suministro de carbono de la planta huésped translocado al hongo que beneficia a la colonización MA (Hawkes *et al.*, 2008). Rillig *et al.* (2002) en pastizales del Norte de California mostraron que los porcentajes de colonización de MA aumentaron debido a condiciones favorables en el suelo para el crecimiento de hifas y una mayor asignación de carbono de las plantas a los hongos MA, o una combinación de estos factores. Los estudios de la ecofisiología de las MA en condiciones *in vitro* han demostrado que algunas etapas del ciclo de vida fúngico, por ejemplo, la germinación de esporas (Daniels y Trappe, 1980) y el crecimiento inicial de las hifas (Liu *et al.*, 2004), responden a las temperaturas, por ejemplo, el alargamiento de las hifas de MA aumentó en un 50% con un aumento medio de 5 °C (15 - 20 °C) (Tommerup, 1983). Según la teoría de "recompensas recíprocas", los hongos MA brindan más "beneficios" a las plantas que suministran más carbohidratos durante la simbiosis (Kiers *et al.*, 2011), por lo que es de esperar que las plantas de invernadero con mayor humedad

de suelo y temperaturas suministraron más carbohidratos que aquellas plantas en condiciones de campo.

Por otro lado, las condiciones contrastantes de temperatura y humedad del suelo entre las plantas creciendo en el campo e invernáculo, determinó una respuesta diferencial en los tratamientos de frecuencia de defoliación sobre el grado de colonización de MA en las raíces, principalmente en su magnitud (Fig. 5.7). Es decir, se detectaron diferencias significativas en el grado de colonización de MA entre los tratamientos TF-6 y TF-0 (control) para plantas de campo, y entre TF-0 y TF-2 respecto a TF-6 para las plantas en invernáculo. Esto podría analizarse considerando que la remoción de tejido vegetal y en consecuencia el nuevo desarrollo de hojas en la planta de *R. virescens* se dieron a expensas de las raíces, en donde la demanda para generar nuevos tejidos aéreos (hojas y brotes) fue provista por las reservas de carbono de las raíces de las plantas en aquellos tratamientos de mayor frecuencia de defoliación (TF-6), y donde la mayor demanda de las reservas fue más marcada en las plantas de invernadero al presentar un mayor crecimiento respecto a las plantas de campo. Dawson *et al.* (2000) han demostrado que el crecimiento de nuevas hojas genera una asignación reducida de los recursos de carbono a las raíces y en consecuencia una disminución en la biomasa de las raíces. Crawford (2000) utilizando etiquetado C<sup>14</sup> demostró que la translocación de C de los brotes a las raíces estaba ausente después de la defoliación. Por lo tanto, suponemos que al disminuir el flujo de C a los hongos MA, disminuyó también la asignación de C a las raíces de las plantas, siendo más marcado este proceso en el tratamiento de mayor frecuencia de remoción foliar. Las alteraciones en el crecimiento de la biomasa de la raíz probablemente reflejan una asignación reducida de carbono a las partes subterráneas debido a la defoliación repetida de la parte aérea (Johnson y Matchett, 2001). Sin embargo, las especies nativas perennes de los pastizales áridos y semiáridos de Argentina, entre ellas *R. virescens* (Borelli y Oliva, 2001), son especies que toleran al pastoreo con estrategias que podrían reasignar carbono a los tejidos por encima del suelo para reponer rápidamente la superficie fotosintética (hojas verdes) removida por los herbívoros (Briske y Richards, 1995). En este sentido, las plantas defoliadas pueden beneficiarse del funcionamiento de las MA para estimular el crecimiento compensatorio de las plantas (Kula *et al.*, 2005). Esto podría ser considerado en el tratamiento TF-2 para plantas de invernáculo y campo que no mostraron disminución de BR y en la colonización MA, con valores iguales a las plantas no defoliadas y a su vez tuvo una

tendencia a mayores valores de la BAAV. Esto parecería tener la particularidad de permitir a las plantas de *R. virescens* beneficiarse de la defoliación con tiempos > 50 días de descanso entre cortes, en los que el nuevo tejido permite mantener el equilibrio bidireccional de la simbiosis en el intercambio de carbono por parte de la planta y nutrientes por parte del hongo.

#### **5. 4. 4. Relación entre la respuesta de las plantas y las micorrizas**

En la simbiosis MA existe un mutualismo de relaciones entre ambos simbios (planta vasculares-hongos MA) que están estrechamente interrelacionados, y donde los efectos sobre las plantas tienen un efecto sobre los microorganismos asociados a ellas (Smith y Read, 2008). De esta manera, las respuestas de las plantas son importantes para analizar qué pasa con sus simbios en las raíces. En el presente estudio se determinó una relación lineal negativa entre la BAR y la colonización de hongos MA (Fig. 5.9B). Gehring y Whitham (1994) sostienen que la remoción de tejido vegetal tiende a disminuir la colonización de MA bajo el supuesto de que el carbono fijado por las hojas se reduciría, y consecuentemente no mantendría la simbiosis ya que ella demanda el 20 % de los fotosintatos fijados por la planta (Jakobsen y Rosendahl, 1990). Una revisión actualizada de Gehring y Whitham (2002) que incluyó otras especies de plantas, encontraron patrones similares, la colonización disminuyó con la presión de herbivoría en el 64.3% de las especies de plantas estudiadas, un 4,8% aumentó, y el 30,9% no se vio afectada. Por lo tanto, se podría considerar de esta manera que los estudios del impacto del pastoreo, ya sea aplicada con diferentes intensidades de remoción de la biomasa área, o con diferentes frecuencias de defoliación, las respuestas de la colonización de hongos MA son dependiente de la especies de plantas hospedadora, donde algunas especies de plantas, pueden compensar su crecimiento después de una defoliación frecuente, sin alterar la simbiosis MA (Gehring y Whitham, 2002; Walling y Zabinski, 2006; Barto y Rillig, 2010). Nuestros resultados mostraron que la colonización de los hongos MA presentan una dependencia con las raíces de las plantas de *R. virescens*, que se evaluaron por medio correlaciones y relaciones positivas entre de su biomasa radicular y el grado de colonización de hongos MA (Fig. 5.9 A). Klironomos *et al.* (2004), en los pastizales del Norte de los Estados Unidos, han encontrado que la biomasa de raíces y la colonización de MA en la especie *Bromus inermis* estuvieron influenciadas negativamente por la frecuencia de recorte, determinando que la menor

biomasa de raíces de las plantas se asoció con una menor colonización de MA en las plantas. En el presente estudio también se determinó una relación lineal positiva entre el área foliar de las plantas de *R. virescens* y la colonización de hongos MA en sus raíces (Fig. 5.9 C). Garrido *et al.* (2010) demostraron una relación positiva entre el área foliar, la biomasa de la raíz y la colonización de hongos MA. Por su parte, Piippo *et al.* (2011) consideraron que el tamaño de la planta es un factor importante en la estructuración de las comunidades de MA. Es decir, aumentos en la colonización en las raíces se relaciona con una mayor área basal y número de macollos en las especies de plantas de gramíneas permitiría contribuir con una mayor cantidad de hojas fotosintéticas, generando mayor aporte de carbono fotosintético que se puede transferir a las raíces, aumentando así su capacidad de asociación con MA (Piippo *et al.*, 2011; Ambrosino *et al.* 2020).

## 5. 5. CONCLUSIÓN

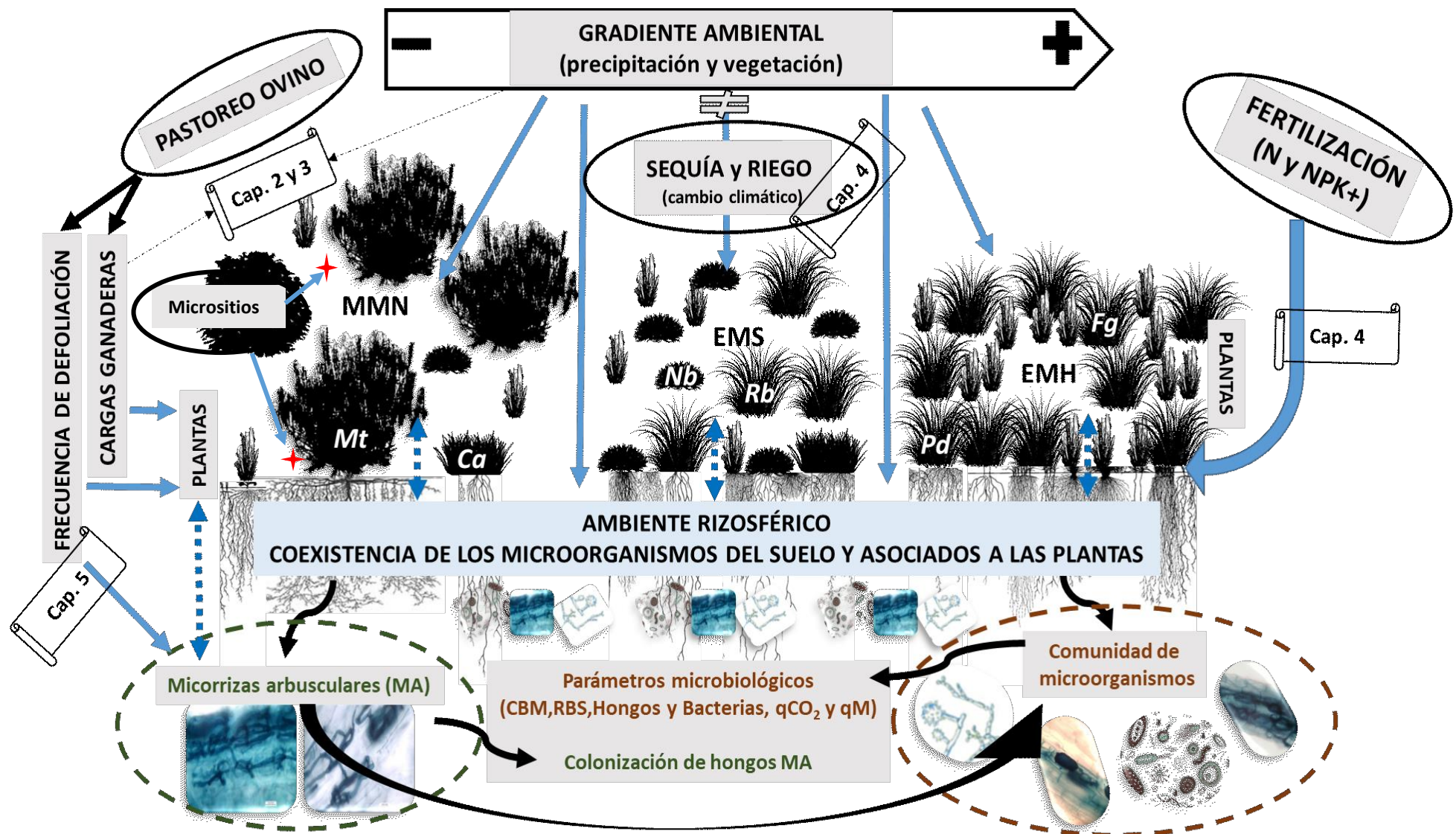
Los resultados del presente estudio enfatizan la importancia de la realización de ensayos duales que aborden aspectos tanto experimentales bajo condiciones controladas (invernadero), como situaciones de las condiciones naturales del ecosistema (campo). Los ensayos realizados sobre la especie *R. virescens* que es representativa de los ecosistemas Australes de Patagonia sugieren que la defoliación simulada que imitarían a los herbívoros (ovejas) influyen en las respuestas de la planta y de los hongos MA asociados. La frecuencia de defoliación influye en la respuesta de las plantas de *R. virescens* y los hongos MA, en donde una remoción de tejido foliar de frecuencia elevada de defoliación (intervalos entre corte de 21 días) para los tratamientos TF-6, afectaron negativamente a las plantas y a la simbiosis MA. El estudio de las condiciones de campo e invernadero dejan evidencias que la humedad del suelo y temperaturas del aire aumentan la colonización de MA en las plantas y a su vez brindan un mayor crecimiento para las plantas de *R. virescens*. Las respuestas parecen estar fuertemente relacionadas con el desarrollo de la parte aérea vegetal y subterránea que se acompañan de una redistribución del carbono de la planta. Posiblemente la clave del proceso es mantener una retroalimentación positiva para la simbiosis MA, que beneficiara el desarrollo de las plantas y sus posibles efectos positivos para los ecosistemas semiáridos de Patagonia.

## **Capítulo 6**

### **DISCUSIÓN GENERAL**

La presente tesis complementa la información existente sobre los ambientes naturales de la Patagonia Austral, resaltando la importancia que tienen los microorganismos del suelo y los simbioses asociados a las plantas, como las micorrizas arbusculares, para el funcionamiento y la sostenibilidad de estos ecosistemas. El estudio abarcó dos aspectos de las comunidades de microorganismos del ambiente rizosférico del suelo (Fig. 6.1). Uno de ellos fueron las variables microbiológicas, como el carbono de la biomasa de los microorganismos de suelo, hongos y bacterias totales del suelo, la respiración basal y los coeficientes ecofisiológicos, abordados en los Capítulos 2 y 4. El segundo enfoque se centró en el estudio de las micorrizas arbusculares que son hongos simbióticos con las plantas (Capítulos 3 y 5). Los objetivos de los Capítulos 2 y 3 de la tesis tuvieron como foco de análisis el impacto del pastoreo ovino con dos situaciones de carga ganadera de largo plazo contrastantes (moderada vs alta) en distintos ecosistemas de Patagonia Sur. Para ello, se seleccionaron tres áreas ecológicas (matorral de mata negra (MMN), estepa magallánica seca (EMS) y estepa magallánica húmeda (EMH)) en un gradiente ambiental (precipitación y temperaturas), las cuales presentan diferentes comunidades vegetales y características edáficas que influyeron sobre los parámetros microbiológicos del suelo evaluados y sobre los simbioses micorrizicos arbusculares (Fig. 6.1). En el Capítulo 4 se abordó experimentalmente los impactos que generaría el cambio climático (ej., sequía) sobre las comunidades de microorganismos del suelo, exclusivamente bajo tratamientos manipulativos del agua que llega al suelo (Fig. 6.1). Asimismo, se evaluó las implicancias que tendría la variación en el contenido de nutrientes en estos ecosistemas para maximizar la producción de los pastizales y sus consecuencias en los microorganismos edáficos. Por último, en el Capítulo 5, en ensayos de campo e invernadero, se evaluó la respuesta de las micorrizas arbusculares a diferentes frecuencias de defoliación sobre la especie *Rhizodermis virescens* como proxy a los sistemas de pastoreo que se realizan en Patagonia Sur (Fig. 6.1).

En el presente capítulo, se presentan los principales hallazgos de la tesis, demostrando la importancia de la información generada, dado que las comunidades de microorganismos del suelo intervienen en el mantenimiento de los procesos y funciones del ecosistema. Asimismo, se presentan aspectos de aplicación práctica de los resultados obtenidos y se plantean los lineamientos de investigación futuras que permitirían profundizar el conocimiento sobre el rol de los microorganismos del suelo en el manejo de los ecosistemas naturales.



**Fig. 6.1.** Esquema de la presente tesis integrando las temáticas abordadas en cada capítulo en un gradiente ambiental, vegetal y de pastoreo a través de las cargas ganaderas ovinas de largo plazo (Cap. 2 y 3), los ensayos experimentales de fertilización mineral, sequía y riego (cambio climático) (Cap.4) y los ensayos de frecuencia de defoliación que simulan los sistemas de pastoreo (Cap. 5). El gradiente ambiental está determinado principalmente por las precipitaciones y las comunidades de plantas en las áreas ecológicas de matorral de mata negra (MMN) con ~155 mm/año (micrositios canopeo vs interparche), estepa magallánica seca (EMS) con ~ 230 mm/año y estepa magallánica húmeda (EMH) con ~ 250 mm/año. Sobre la comunidad de microorganismos se determinaron los parámetros de carbono de la biomasa microbiana (CBM), respiración biológica del suelo (RBS), hongos y bacterias totales de suelo, coeficiente metabólico ( $qCO_2$ ), coeficiente microbiano ( $qM$ ) y la colonización de micorrizas arbusculares (MA) en las raíces de plantas (*Pd*) *Poa duseii*, (*Rb*) *Rytidosperma virescens*, (*Fg*) *Festuca gracillima*, (*Nb*) *Nardophillum bryoides*, (*Mt*) *Mulguraea tridens* y (*Ca*) *Carex argentina* representativas de estos ecosistemas Patagónicos.



## **6.1. Comunidades de microorganismos del suelo en el gradiente ambiental de la Patagonia Sur**

En el capítulo 2 y 3 se llevó a cabo un análisis del efecto del gradiente climático y vegetacional sobre las variables microbiológicas como ser el carbono de la biomasa microbiana (C-BM), respiración biológica del suelo (RBS), abundancia de hongos y bacterias totales del suelo, micorrizas arbusculares (MA) y los coeficientes ecofisiológicos microbianos, estudiados en el Sur de Santa Cruz, siendo éste el primer estudio en estos ecosistemas Australes de Patagonia.

Las mayores precipitaciones medias anuales y cobertura vegetal en la EMH determinaron un aumento en las variables microbiológicas del suelo (C-BM y RBS) (Capítulo 2), aunque esto no fue observado sobre la colonización de MA (Capítulo 3). La precipitación es un regulador importante de los procesos microbianos, incidiendo en la producción primaria neta de los sitios de regiones semiáridas (Jobbágy *et al.*, 2002; Austin *et al.*, 2004). Siendo las plantas las que determinan el aporte de material vegetal que se deposita en el suelo, donde la mayor cobertura vegetal crea un ambiente que promueve la biomasa y actividad microbiana (Goberna *et al.*, 2007). Observamos que las mayores coberturas vegetales y precipitaciones en el sitio de la EMH se acompañaron con valores superiores de carbono orgánico del suelo, el cual es de vital importancia como fuente de recurso para la biota edáfica (Lauber *et al.*, 2008; Richter *et al.* 2018). Además, en las distintas áreas ecológicas, la respuesta positiva de la RBS fue atribuida al C-BM del suelo. Esto se ha evidenciado en varios estudios previos para distintos tipos de suelos, donde el crecimiento microbiano tiene como principal resultado incrementos en la respiración heterotrófica del suelo en los ecosistemas (Treseder, 2008; Riggs y Hobbie, 2016).

Los coeficientes ecofisiológicos microbianos estudiados mostraron que el  $qCO_2$  fue mayor en las áreas MMN y EMH, evidenciando una disminución de la eficiencia de los microorganismos debido a incrementos en la RBS respecto a su C-BM. Se ha demostrado que el  $qCO_2$  difiere en los ecosistemas asociadas a factores biológicos, seguido de parámetros edáficos y climáticos (Xu *et al.*, 2017). Las áreas ecológicas presentaron diferencias en los valores de  $qM$  del suelo (EMH < EMS y MMN) con valores inversos entre el C orgánico y  $qM$ . Según Sparling (1985, 1992), el  $qM$  representa entre el 1-4 % del carbono orgánico del suelo, relacionado a la eficiencia, estabilidad, formación y de conversión de la materia orgánica al estar integrada por esta fracción viva como el C-BM (Anderson y Domsch, 1986, 1990).

Por otro lado, no hubo diferencias en la abundancia de bacterias totales en los suelos de las áreas ecológicas. Girvan *et al.* (2003) y Buckley y Schmidt (2001) han reportado similares resultados al estudiar la abundancia de bacterias en parcelas de largo plazo con comunidades vegetales diferentes. No obstante, se determinó diferencias significativas en la abundancia de hongos totales del suelo entre las áreas ecológicas, donde el MMN tuvo una menor abundancia de hongos respecto a las áreas EMS y EMH. Este comportamiento puede ser explicado por las diferencias en las propiedades del suelo (pH, carbono orgánico, N y P) que afectaron a las comunidades de hongos del suelo (Lauber *et al.*, 2008; Ford *et al.*, 2013). Además, la abundancia de hongos y bacterias totales del suelo mostraron una variación interanual determinado por las variaciones en los factores climáticos (Courty *et al.*, 2008; Maestre *et al.*, 2015).

Por lo tanto, se acepta parcialmente los supuestos de la hipótesis planteada, donde el C-BM, y la abundancia de hongos, y la RBS se correlacionan positivamente con las precipitaciones en el gradiente ambiental de las áreas ecológicas, en cambio, esto no fue observado en las abundancias de bacterias totales del suelo.

Considerando la importancia de la simbiosis radical y que en el ambiente rizosférico coexisten diferentes comunidades de microorganismos, en el capítulo 3 estudiamos exclusivamente la simbiosis MA también en estas áreas ecológicas de la Patagonia Austral, dado que las MA son microorganismos que se han encontrado en todos los ecosistemas y están presentes en las raíces de aproximadamente el 80% de las plantas terrestres (Smiht y Read, 2008). Los datos de esta tesis mostraron que la mayoría de las especies de plantas nativas dominantes de la Patagonia Austral entre ellas *Poa duseinii*, *Rytidosperma virescens*, *Festuca gracillima*, *Nardophillum bryoides*, *Mulguraea tridens* fueron hospedadoras de MA. Fue excepción el caso de *Carex argentina*, que se comportó como una especie no hospedadora. Hay trabajos que han informado que el género *Carex* y la familia Cyperaceae se describen como plantas no micorrízicas (Tester *et al.*, 1987; Miller *et al.*, 1999), y excepcionalmente unas pocas especies y en determinadas circunstancias presentaron comportamiento facultativo. Los valores de la colonización de MA de las plantas de este trabajo dependieron de las formas de vidas de las especies vegetales, como lo han informado Hoeksema *et al.* (2010) y Davison *et al.* (2020). Así mismo, los resultados de esta tesis muestran que la la frecuencia de colonización de MA de las plantas en la Patagonia Austral varió dependiendo del área ecológica, donde la respuesta fue intrínseca a las comunidades

de plantas de cada área ecológica. Por ejemplo, en la EMH con un predominio de especies gramíneas (*P. duseii*, *R. virescens* y *F. gracillima*) presentó menores valores de colonización de MA comparado con los sitios donde la comunidad de especies vegetales estuvo integrada por sub-arbustos y arbustos (*N. bryoides*, *M. tridens*) en las áreas ecológicas de la EMS y MMN. Esto también ha sido reportado y coincide que la colonización de MA es menor en plantas herbáceas y mayor en especies de sub-arbustos y arbustos (Smith y Read, 2008). Es decir, los resultados resaltan la dependencia de las plantas a la colonización de MA principalmente en los ambientes de los MMN y EMS, siendo opuesto a la respuesta en los parámetros de microbiológico como el C-BM y la RBS (Capítulo 2). Nouri *et al.* (2014) y Miller *et al.* (2012) sugieren que las plantas promueven la colonización de MA en la raíz siempre que exista alguna limitación (nutrientes y/o disponibilidad de agua en el suelo) para las plantas, aspecto que tendría consistencia con nuestros resultados en las áreas ecológicas MMN y EMS. Esto brindaría a las plantas hospedadoras una mayor tolerancia a estreses bióticos y abióticos (Smith y Smith, 2011). Por lo tanto, se rechaza el supuesto de la hipótesis planteada de que la colonización de los hongos MA en las áreas ecológicas de la Patagonia Austral tendrán una correlación positiva con las mejores condiciones bióticas y abióticas del sitio.

En relación al efecto del canopeo del arbusto *Mulguraea tridens* en el área ecológica MMN, hemos confirmado la hipótesis del efecto positivo que genera el canopeo en comparación a los suelos del interparche. Esto estaría dado por niveles más altos de recursos (restos de material vegetal, agua, materia orgánica y nutrientes del suelo) debajo del canopeo de los arbustos en relación al interparche (Brodie *et al.*, 2002; Prieto *et al.*, 2011) denominado efecto de 'isla fertilidad' (Garner y Steinberger, 1989).

## **6.2. Microorganismos del suelo en relación a la fertilización mineral - sequía y riego en ambientes de Patagonia Sur**

En el capítulo 4 de la presente tesis se determinó experimentalmente la influencia de del aporte de nutrientes a través de la fertilización nitrogenada (N) y con macro y micronutrientes (NPK+), y los escenarios de variaciones de la precipitación (sequía y riego) en ambientes de la estepa magallánica seca (EMS) sobre el C-BM, RBS y los coeficientes ecofisiológicos microbianos. Este planteo nos permitirá entender cómo responderán los microorganismos del suelo al agregado de nutrientes minerales por prácticas manejo de fertilizaciones y frente a los efectos del cambio climático sobre

todo en el patrón de las precipitaciones (sequía) en estos ecosistemas semiáridos de la Patagonia. Mientras que el C-BM no se vio afectado cuando se aplicó sólo N, una fertilización más equilibrada de nutrientes (NPK+) determinó un aumento del CMB. Según Zhong *et al.* (2010) una fertilización (NPK+) responde a la demanda nutricionales de las plantas y promueve el aumento de la biomasa microbiana. Los valores superiores de C-BM fueron posiblemente debido a mayores restos orgánicos de la biomasa aérea que llega al suelo y exudados de las raíces que promueven un aumento en la biomasa microbiana, confirmado en este estudio, con la relación positiva entre el C-BM y la biomasa vegetal total de las plantas y de gramíneas. Giacometti *et al.* (2013) y Strecker *et al.* (2015) encontraron esta misma relación en suelos que fueron sometidos a aplicaciones de fertilizaciones inorgánicas, atribuidos por un aumento en la disponibilidad de sustrato de carbono aportado por la biomasa vegetal y C derivados de las raíces.

En cambio, la RBS disminuyó en los suelos que fueron fertilizados con N y NPK+, lo cual fue confirmado en otros ensayos en diferentes biomas (Stark y Grellmann, 2002, Thakur *et al.*, 2015). La fertilización disminuye la RBS por inhibición o disminución de actividades de ciertas enzimas que intervienen en los procesos de mineralización de los compuestos orgánicos del suelo y ciclos de los nutrientes (Eivazi *et al.*, 2003; Allison y Vitousek, 2005; Spohn *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2017). Por otro lado, existiría una limitación de C en estos ambientes de Patagonia para la actividad microbiana, que se acentuaría con la adición de N (Peng *et al.*, 2011).

Los resultados mostraron que la fertilización disminuyó el cociente metabólico ( $qCO_2$ ), indicando que la fertilización estimuló el crecimiento de microorganismos (mayor C-BM), y favoreció el desarrollo de una comunidad microbiana energéticamente más eficiente (menor  $qCO_2$ ) dado por los valores de menor RBS. De manera similar Giacometti *et al.* (2013) y Strecker *et al.* (2015) han determinado que la fertilización redujo el  $qCO_2$ . Asimismo, el coeficiente microbiano ( $qM$ ) tuvo una tendencia de valores superiores en el tratamiento de fertilización NPK+. Es decir, parecería que la fertilización que incluye macro y micronutrientes (NPK+) promovería la acumulación de C orgánico en los suelos.

Respecto a los supuestos planteados, la hipótesis para el C-BM se acepta parcialmente dado que la respuesta no fue consistentes bajo ambos tratamientos de fertilización, sino que hubo un aumento del C-BM en el tratamiento de fertilización más equilibrada (NPK+). Por el contrario, el postulado de la hipótesis en relación a la RBS

no fue aceptada, dado que se obtuvo una respuesta inversa cuando los suelos fueron fertilizados.

La sequía impuesta como tratamiento no varió el C-BM comparado a la precipitación del sitio (control). Según, Geng *et al.* (2015) al evaluar un gradiente experimental de sequía y sus impactos sobre el C-BM, encontraron que en el suelo existe un umbral de sequía definido por un contenido de humedad de cada suelo y una adaptación de las comunidades de microorganismos. Esto en parte ha sido comprobado en esta tesis, debido a que el contenido de C-BM bajo las condiciones de estrés hídrico moderada impuestas, no difirió con el tratamiento de precipitación ambiental, suponiendo que hay una amplitud ecológica de los microorganismos a la sequía para estos ambientes. Sin embargo, es importante resaltar que el C-BM aumentó con una mayor disponibilidad de agua del suelo aplicada por el riego, comparado con el control. En forma similar, otros estudios han encontrado que los tratamientos de manipulación de la precipitación a través de riego estimularon un mayor C-BM, sugiriendo que la disponibilidad de agua es un factor abiótico importante que regula el crecimiento de las comunidades microbianas (Liu *et al.*, 2009; Zhao *et al.*, 2016). En este estudio se demostró que existieron correlaciones positivas entre el agua aportada al suelo, la biomasa vegetal y C-BM, lo cual fue observada en otros estudios (Godley, 2004; Liu *et al.*, 2008).

En cambio, no se encontraron diferencias en la RBS en el gradiente de precipitaciones que llegan al suelo logrado con los tratamientos de sequía y riego. Moinet *et al.* (2016) sugieren que la respiración heterotrófica (microbiana) es insensible a los cambios en el contenido de humedad del suelo, ya que depende principalmente de la disponibilidad de sustrato que presentan los suelos (C lábiles y fácilmente disponible) y su accesibilidad (mayor superficie específica del suelo) que son utilizados por los microorganismo.

Los resultados de  $qCO_2$  determinaron que los suelos de los tratamientos de sequía y riego tuvieron una mayor eficiencia por unidad de biomasa microbiana. Esto demuestra que similar RBS puede ser mantenida por diferentes biomasa de microorganismos, determinado por una eficiencia metabólica diferencial (Anderson y Domsch, 1990; Fontaine *et al.*, 2004). Los valores bajos de  $qCO_2$  en el tratamiento riego demuestran una mayor eficiencia de los microorganismos en la utilización de C con valores más altos de  $qM$ . Esto puede conducir a un mayor secuestro de C por vía

microbiana y una disminución del potencial de emisiones de CO<sub>2</sub> a la atmósfera (Anderson y Domsch, 1990; Treseder, 2008; Bradford *et al.*, 2013).

La hipótesis planteada en relación al efecto positivo del riego sobre el C-BM es aceptada, pero es rechazada respecto del efecto generado por la sequía sobre la biomasa de los microorganismos dado que no difirió respecto al control. En cambio, los supuestos sobre la RBS son rechazados dados que ambas condiciones de tratamiento (sequía y riego) no afectaron a este parámetro microbiológico.

Se debería continuar con ensayos más a largo plazo para confirmar estos resultados, dado que 2 años de ensayos desde la aplicación de los fertilizantes o la imposición de tratamientos de sequía, podrían no ser suficientes en nuestros ambientes áridos y templados-fríos de Patagonia. Ciertamente, parecería que en el corto plazo no existe un efecto de los tratamientos que repercutan en cambios pronunciados en las plantas y en las características del suelo (carbono orgánico), que consecuentemente incidan en las respuestas de los microorganismos del suelo.

### **6.3. Comunidades de microorganismos y los efectos del pastoreo**

En el capítulo 2 y 3 se estudió el efecto del pastoreo en relación a las cargas ganaderas ovinas de largo plazo en las distintas áreas ecológicas de la Patagonia Sur, sobre la biomasa microbiana (C-BM), respiración biológica del suelo (RBS), abundancia de hongos y bacterias totales del suelo, micorrizas arbusculares (MA) y los coeficientes ecofisiológicos.

Las altas cargas ganaderas ovinas de largo plazo afectaron negativamente los parámetros del suelo y sobre las variables microbiológicas del suelo (Capítulo 2), lo cual coincide con otros estudios en ecosistemas de pastizales (McSherry y Ritchie, 2013, Liu *et al.*, 2015). El efecto del pastoreo parece incidir de manera indirecta, a través de cambios en los niveles de carbono del suelo debido principalmente a una disminución de la cobertura vegetal y a la pérdida de C del suelo que se acompaña con procesos de erosión dado la particularidad de estos ecosistemas semiáridos (Peri, 2011; Peri *et al.*, 2016, 2018).

Sin embargo, la carga ganadera ovina no modificaron las comunidades de bacterias y hongos totales del suelo, lo que también ha sido reportado en otros estudios (Patra *et al.*, 2005; Egan *et al.*, 2018). En este sentido, en el Capítulo 3, se evaluó las respuestas de los hongos MA al pastoreo evaluado sobre la colonización MA. La interpretación de los resultados permiten determinar, que en las tres áreas ecológicas

(MMN, EMS y EMH) y las 5 especies y 3 familias estudiadas que incluyen arbustos (*M. tridens* - *Verbenaceae*), sub-arbustos (*N. bryoides* - *Asteraceae*) y gramíneas (*F. gracillima*, *R. virescens* y *P. dusenii* - *Poaceae*), las cargas ganaderas contrastantes, no modificaron en líneas generales a la colonización MA. En este mismo sentido, Barto y Rillig (2010) no encontraron efectos sólidos en la simbiosis micorrízica en estudios sobre los impactos del pastoreo.

En el capítulo 2 y 3, la interacción entre las cargas ganaderas y las áreas ecológicas de Patagonia Sur, determinaron respuestas diferenciales sobre los microorganismos del suelo y las micorrizas arbusculares, dadas por las características propias de cada sitio que dependieron de las condiciones climáticas, de vegetación y características del suelo. Por ejemplo, mientras que en las EMS y EMH, la carga ganadera alta afectó los parámetros microbiológicos evaluados, en el MMN no se detectó diferencias según el rango de las cargas animales evaluadas (capítulo 2). Por el contrario, como se demostró en el capítulo 3, la EMH, sitio con mayor precipitación y con dominancia de gramíneas, la colonización de MA disminuyó significativamente con la carga ganadera alta. Sin embargo, en las otras dos áreas ecológicas, EMS y MMN, no se observó cambio en la colonización de MA asociados al pastoreo entre las cargas moderas y altas. Esto puede atribuirse por el efecto atenuante de la mayor presencia de especies sub-arbustivas y arbustivas sobre la colonización de MA en las áreas EMS y MMN. Cavagnaro *et al.* (2017) plantean que los arbustos actúan como un refugio contra el pastoreo para las plantas y simbiosis micorrízica, sumado a que las especies sub-arbustivas y arbustivas tienen raíces desarrolladas que alcanzan mayores profundidades de exploración en el suelo, lo que les permite minimizar los efectos negativos del pastoreo (Bertiller *et al.*, 2004, 2005).

A nivel de especies individuales, la colonización MA fue influenciada de manera directa con las respuestas que experimenta la planta hospedadora. En la presente tesis (capítulo 3) cuando se analizó la colonización MA sobre las especie de planta, el efecto del pastoreo también fue diferencial según el área ecológica. Esto estaría respaldado por la preferencia y selectividad que ejercen las ovejas sobre las especies de plantas más palatables o que están disponible para su consumo (Borrelli y Oliva, 2001; Andrade *et al.*, 2015). Siendo *Poa dusenii* y *Rytidosperma virescens* especies de preferencia en la dieta por parte de los ovinos, se podría magnificar el efecto negativo en la simbiosis cuando se manejan altas cargas animales. Barto y Rillig

(2010) han planteado que los tipos de planta hospedadora son moderadores significativos del efecto del pastoreo sobre la simbiosis MA.

La colonización de MA en las raíces no sólo es influenciada por la carga animal (capítulo 3), sino también por la frecuencia de defoliación de biomasa vegetal (capítulo 5) que representa diferentes tipos de manejo animal (pastoreo continuo o rotativo).

En este sentido, en el capítulo 5 se determinó el efecto de distintas frecuencias de defoliación sobre plantas de *R. virescens* y la colonización de MA en condiciones naturales de campo y bajo condiciones contraladas en invernadero.

Las condiciones ambientales en el ensayo de invernadero (temperatura y humedad del suelo no limitantes) mostraron que las plantas de *R. virescens* aumentaron el crecimiento de la biomasa aérea vegetal y de raíces, al aprovechar mejor los recursos disponibles, lo cual ha sido confirmado en otros estudios (Austin *et al.*, 2004; Piippo *et al.*, 2011). A su vez, en el presente estudio se pudo determinar que las condiciones de crecimiento de las plantas *R. virescens*, tuvieron un efecto sobre la simbiosis MA, donde las plantas creciendo en invernadero determinaron mayor colonización de MA respecto a las plantas del campo. Este aumento podría ser una respuesta fúngica directa con mayor crecimiento de hifas (Heinemeyer y Fitter, 2004; Heinemeyer *et al.*, 2006) o un efecto indirecto a través de un aumento del suministro de carbono de la planta huésped translocado al hongo que beneficia a la colonización MA (Hawkes *et al.*, 2008). Según la teoría de "recompensas recíprocas", los hongos MA brindan más "beneficios" a las plantas que suministran más carbohidratos durante la simbiosis (Kiers *et al.*, 2011), lo cual parecería ser confirmado para las plantas creciendo en invernadero.

Las plantas de *R. virescens* cuando fueron sometidas a distintas frecuencias de defoliación su biomasa área acumulada fue similar entre los tratamientos, indicando que las plantas siguieron creciendo en su parte aérea con aparición de nuevas hojas y brotes. Este crecimiento parecería ser a expensas del sistema de raíces de las plantas en aquellos tratamientos de mayor frecuencia de defoliación (TF-6), al mostrar una disminución de la biomasa de raíces. Algunos estudios han informado que la defoliación frecuente reduce la biomasa de las raíces (Briske y Richards, 1995; Holland *et al.*, 1996; Flemmer *et al.*, 2002; Garrido *et al.*, 2010). En cambio, la remoción de biomasa vegetal a las plantas de *R. virescens* con intervalos entre cortes > 50 días (TF-2), permitió que las plantas se recuperen con incrementos tanto en el componente aéreo como subterráneo.



El efecto del pastoreo simulado intenso ~ 65 % de remoción vegetal, impactó de manera negativa sobre la colonización de hongos MA dependiendo de la frecuencia de la defoliación a las que las plantas fueron sometidas. Esto coincide con otros estudios que evaluaron la frecuencia de la defoliación sobre las respuestas de las MA (Allsopp, 1998; Saito *et al.*, 2004). Mientras que la colonización MA en raíces de *R. virescens* no se vio afectada en plantas sometidas a una baja frecuencia de defoliación (intervalos de descanso entre cortes mayores a 50 días), la colonización MA disminuyó cuando la frecuencia de defoliación fue mayor con solo 21 días de recuperación. Van der Hayde *et al.* (2017) encontraron que las diferencias en los hongos MA entre plantas defoliadas versus plantas no defoliadas fueron estrictamente dependiente del tiempo de descanso y/o recuperación. La colonización de los hongos MA y las respuestas a los tratamientos de frecuencia de defoliación indicarían que la limitación del carbono para la simbiosis podría ser un factor importante al no permitirle a la planta recuperar tejido fotosintético. Esto estaría de acuerdo con la teoría de la limitación del C para la simbiosis entre las plantas-hongos MA que fue postulada en estudios anteriores por Gehring y Whitham (1994, 2002). Esto, indirectamente se relaciona en el presente estudio al determinar una relación negativa entre la biomasa aérea removida y la colonización de hongos MA.

En las plantas del campo e invernáculo se determinó una respuesta diferencial en los tratamientos de frecuencia de defoliación sobre el grado de colonización de MA en las raíces. Esto podría analizarse considerando que la remoción de tejido vegetal, y en consecuencia el nuevo desarrollo de hojas en la planta de *R. virescens*, se dieron a expensas de las raíces, en donde la demanda para generar nuevos tejidos aéreos (hojas y brotes) fue provista por las reservas de las raíces de las plantas en aquellos tratamientos de mayor frecuencia de defoliación (TF-6), y en mayor medida para las plantas de invernadero al presentar un mayor crecimiento respecto a las plantas de campo. Dawson *et al.* (2000) han demostrado que el crecimiento de nuevas hojas genera una asignación reducida de los recursos de carbono a las raíces y en consecuencia una disminución en la biomasa de las raíces. Por lo tanto, suponemos que, al disminuir el flujo de C a las raíces de las plantas, esto también redujo la asignación de C a los hongos MA, siendo más marcado este proceso en el tratamiento de mayor frecuencia de remoción foliar.

Basados en los resultados obtenidos, se acepta la hipótesis planteada respecto a que el C-BM, la abundancia de hongos y bacterias totales, y la RBS se correlacionan

negativamente con el pastoreo, principalmente de manera indirecta al afectar a las plantas y las propiedades del suelo (carbono orgánico del suelo). Por otro lado, se acepta de manera parcial la hipótesis planteada respecto a que la simbiosis de hongos MA en las plantas presentan una relación negativa con cargas ganaderas altas de largo plazo. Esta hipótesis fue aceptada de manera parcial dado que las cargas ganaderas incidieron principalmente en las especies más preferidas por el ganado ovino como ser *P. dusenii* y *R. virescens*. Además, aceptamos la hipótesis de que la colonización de MA respecto de la carga ganadera y los ambientes dependerá de las formas de vida de la especie vegetal estudiadas: los subarbustos y arbustos no se afectarán por la carga ganadera en las áreas ecológicas, por el contrario, las especies herbáceas (gramíneas) disminuirán la colonización MA en sus raíces con las mayores cargas ganaderas dependiendo del sitio. Por último, los resultados permiten aceptar la hipótesis planteada, donde la colonización de los hongos MA disminuyó a medida que aumentamos las frecuencias de defoliación ya que se relacionó con una mayor remoción de biomasa aérea. Las condiciones de crecimiento de las plantas influyeron solo en la magnitud de dicha respuesta.

#### **6.4. Aplicabilidad de los resultados del presente estudio y posibles líneas de investigación futuras**

Los datos generados en estas tesis representan los primeros resultados de parámetros microbiológicos en estos ecosistemas del Sur de Santa Cruz.

Actualmente existe interés en contar con indicadores de calidad del suelo dado que los gobiernos, mercados y productores se han vuelto más conscientes de la necesidad de gestionar el suelo de una manera sostenible para contrarrestar su degradación y consecuente pérdida de la capacidad productiva (FAO, 2015). En este sentido, hay antecedentes en donde estos bio-indicadores ya se han integrado en redes de monitoreo de suelos en toda Europa (soil monitoring networks-SMN) (van Leeuwen *et al.*, 2017). Del mismo modo, Onwosi *et al.* (2019) investigaron un conjunto de parámetros microbiológicos del suelo y destacan que pueden servir como herramientas de bio-monitoreo dado por su sensibilidad frente a los disturbios que se generan en el suelo. En Patagonia Argentina, Marcos y Olivera (2016) han manifestado la necesidad de los programas de monitoreo de suelos destinados a diagnosticar el estado de los suelos y evitar su deterioro, utilizando como herramienta de análisis los parámetros microbiológicos de suelo. Por lo tanto, las variables

microbiológicas del suelo obtenidas en la presente tesis (C-BM, RBS, qCO<sub>2</sub>, qM y micorrizas arbusculares) pueden servir como herramientas de bio-monitoreo en los pastizales de Patagonia Austral. Además, estos parámetros han sido demostrados que son muy útil para avanzar en la comprensión del funcionamiento de la comunidad microbiana del suelo y la importancia de su contribución a los procesos del ecosistema (Vasconcellos *et al.*, 2016; Wardle y Ghani, 2018; Krüger *et al.*, 2018; Onwosi *et al.*, 2019).

Basado en el estudio realizado sobre la planta *R. virescens* (capítulo 5), se determinó que los periodos de recuperación apropiados bajo diferentes sistemas de pastoreo no deberían ser menores a 50 días (umbral) para lograr una optimización en la producción de los pastizales que se acompaña en la simbiosis MA. Tedersoo *et al.* (2020) informaron que las asociaciones entre plantas y las micorrizas son de naturaleza compleja y su interacción en gran medida a pesar de ser “invisible” regula las interacciones competitivas inter- e intra-especies de plantas, por lo cual influyen en aspectos de la ecología y en la supervivencia de las comunidades vegetales en los ecosistemas.

Como línea futura de investigación, y complementaria a los resultados de los capítulos 2 y 3, sería determinar el nitrógeno de la biomasa microbiana (NBM) para profundizar el conocimiento relacionado a los ciclos de nutrientes en estos ecosistemas (Xu y Yuan, 2017; Gonzalez-Polo *et al.*, 2019). En este mismo sentido, dado que las poblaciones totales de bacterias o hongos se mantuvieron relativamente estables en el suelo, sería importante como otra investigación futura abordar el efecto de las intensidades de carga animal sobre los cambios en la abundancia de los grupos de hongos y bacterias más específicos (grupos funcionales de microorganismos) relacionados a los ciclos de los nutrientes (Leff *et al.* 2015). Basado en los resultados del capítulo 4, se considera importante integrar los ensayos de fertilización mineral y sequía (cambio climático) para poder dilucidar si la interacción de ambos factores podría tener un efecto sinérgico o un efecto opuesto sobre las comunidades de microorganismos y sobre el balance de C de la comunidad microbiana. Además, el otro factor que se acompaña al cambio climático son las variaciones en las temperaturas medias anuales para las latitudes de Patagonia Sur (Kreps *et al.*, 2012), por lo que ensayos futuros podrían incorporar las respuestas de las comunidades de microorganismos a aumentos de temperatura e interactuando con sequía en ensayos combinados.

Para complementar los resultados obtenidos del capítulo 5, se podría ampliar el efecto de la frecuencia de defoliación a la colonización MA sobre otras especies de plantas representativas de los ecosistemas de Patagonia Sur. También, sería importante realizar ensayos en parcelas más grandes en donde se integran las comunidades de plantas y evaluar la colonización de MA discriminando en las diferentes estructuras (hifas, vesículas y arbuscúlos) de los hongos (Ambrosino *et al.*, 2020). Otro aspecto importante que podría abordarse es la determinación de la diversidad de micorrizas asociadas a las especies vegetales en estos ambientes Patagónicos, y realizar ensayos que evalúen la potencialidad de utilizar a estos, como inóculos en sitios que evidencian características de deterioro del ecosistema.

En un planteo Regional, se podría incluir parámetros microbiológicos del suelo (ej., C-BM) en la base de datos ya consolidada de las parcelas permanentes de la Red PEBANPA que monitorean y evalúan funciones y tendencias entre parámetros de vegetación, biodiversidad, dinámica forestal, características fisicoquímicas del suelo y manejo del uso de la tierra (Peri *et al.*, 2016). El C-BM es utilizado para estimar el secuestro de C por parte de los microorganismos del suelo. Según, Kheirfam (2020) los microorganismos del suelo en los ecosistemas áridos y semiáridos tienen el potencial de aumentar las reservas de C del suelo dada por incrementos en el C-BM y disminuciones en la emisión de CO<sub>2</sub> producto de su respiración heterotrófica reducida, mitigando de esta manera los impactos del cambio climático.

De esta manera, en la Patagonia Austral los desafíos se centran a prácticas y medidas de manejo sustentables del suelo dirigidas a mantener la biodiversidad biológica del ambiente con énfasis en las respuestas de las comunidades de microorganismos que intervienen en las funciones claves del ecosistema, las cuales a su vez están condicionadas por las prácticas de manejo y por los impactos del cambio climático. En el futuro el monitoreo a largo plazo contemplando estos parámetros biológicos del suelo ayudarían a los tomadores de decisiones a comprender mejor los impactos de las prácticas de uso de la tierra, desarrollar políticas integradas para asegurar el bienestar presente y futuro.

## 6.5. Conclusiones alcanzadas de la tesis

Los resultados de esta tesis son una base para el conocimiento del componente biológico del suelo en las principales áreas ecológicas del Sur de la provincia de Santa Cruz (Patagonia Argentina), definidas cada una como biomas distintos en cuanto a sus características climáticas, comunidades vegetales y edáficas. Esto permitiría poner una mirada no solo en aspectos ecológicos, de que pasa por encima del suelo, sino integrar a los parámetros microbiológicos como verdaderos actores que describen el funcionamiento del ecosistema suelo.

En general esta tesis muestra que el componente biológico del suelo es influenciado por un efecto en cascada e interrelacionado, donde una mayor precipitación promueve el crecimiento y actividad de las plantas (mayor cobertura) y a su vez, ello proporcionan mejoras en las propiedades fisicoquímicas del suelo que benefician al microbioma del suelo, debido a la deposición de mayores restos orgánicos que son utilizados por las comunidades microbiana del suelo para su crecimiento y en consecuencia para la actividad y función que desempeñan en el ecosistema.

Los posibles impactos del cambio climático sobre la biota edáfica en esta región de Patagonia, muestran que una menor precipitación (sequía) no modificaría el C-BM. Sin embargo, es importante resaltar que el C-BM y el qM aumentarían, sumado a que valores bajos del qCO<sub>2</sub> evidencia una mayor eficiencia de los microorganismos en la utilización de C si ocurrieran aumentos en las precipitaciones zonales a causa del cambio climático, sugiriendo nuevamente que la disponibilidad de agua en estos ecosistemas es un factor abiótico importante que regula el crecimiento de las comunidades microbianas y que en el futuro podría conducir a un mayor secuestro de C por vía microbiana y una disminución del potencial de emisiones de CO<sub>2</sub> a la atmosfera. En este contexto, el estudio de las condiciones de campo e invernadero dejan evidencias una vez más, que la humedad del suelo y las temperaturas del aire son determinantes para el microbioma del suelo, con aumentos en el crecimiento de las plantas de *R. virescens* acompañada de una mayor colonización MA.

Por otra parte, los nutrientes del suelo son limitantes y escasos en estos ecosistemas, y es por ello que, las prácticas agronómicas de incorporan insumos externos al ecosistema para maximizar la productividad de los pastizales fueron evaluadas en esta tesis, mostrando que una fertilización más equilibrada de nutrientes (NPK+) estimularía un aumento del C-MB y una disminución de la RBS en los suelos, lo que parece indicar, que esto promueve el desarrollo de una comunidad microbiana

energéticamente más eficiente (menor  $qCO_2$ ), lo que podría promover nuevamente la acumulación de C orgánico en los suelos (mayor  $qM$ ).

El manejo de las cargas ganaderas ovinas en esta región resultan ser moderadores de los efectos en la productividad del ecosistema y en el deterioro del suelo, los datos de esta tesis demuestran que el manejo de cargas ovinas altas potencian los impactos negativos sobre los parámetros microbiológicos comparado a las cargas moderadas, y que ello dependió del área ecológica estudiada. En el caso particular de la simbiosis MA encontramos que el impacto de la remoción de biomasa área en la planta hospedadora dependiendo de la selectividad que el animal realiza en su consumo y que ello magnifica el efecto negativo en la simbiosis cuando se manejan altas cargas ovinas, debiendo prestar atención a las especies *Poa duseii* y *Rytidosperma virescens* dado que la simbiosis MA podría ser una estrategias de supervivencia para estas especies. En cambio, los impactos generados por el pastoreo sobre las comunidades de plantas (área ecológica) pasan a depender de otros factores externos a la simbiosis como lo son, las características del suelo y la relación costo-beneficio experimentada por cada planta hospedadora dentro de cada condición ambiental.

Asimismo, basado en el estudio realizado sobre la planta *R. virescens*, se determinó que los periodos de recuperación apropiados para los diferentes sistemas de pastoreo rotativos no deberían ser menores a 50 días (umbral) para lograr una optimización en la producción de los pastizales y no afectar a la simbiosis MA.

La temática abordada en esta tesis permite comprender el funcionamiento ecológico de los pastizales Patagónicos de una manera integral, al estudiar lo que pasa debajo del suelo para describir el funcionamiento integral del mismo. En este sentido, en la Patagonia Austral los desafíos futuros podrían centrarse en prácticas y medidas de manejo sustentables del suelo dirigidas mantener la biodiversidad biológica de los ambientes con énfasis en las respuestas de las comunidades de microorganismos que intervienen en las funciones claves del ecosistema, las cuales a su vez están condicionadas por las prácticas de manejo y por los impacto del cambio climático. En el futuro el monitoreo contemplando estos parámetros del suelo (C-BM, RBS,  $qCO_2$ ,  $qM$  y micorrizas arbusculares) pueden servir como herramientas de bio-monitoreo para ayudar a los tomadores de decisiones a comprender mejor los impactos de las prácticas de uso de la tierra y así evitar su deterioro y consecuente pérdida de la capacidad productiva, que lleven al desarrollo de políticas integradas que aseguren el bienestar presente y futuro.

## BIBLIOGRAFÍAS

- Abril, A., Villagra, P., Noe, L. (2009). Spatiotemporal heterogeneity of soil fertility in the Central Monte desert (Argentina). *Journal of Arid Environments*, 73(10), 901-906.
- Adu-Gyamfi, J.J., Ishikawa, S., Nakamura, T., Nakano, H. (2000). Genotypic variability and physiological characteristics of crop plants adapted to low- nutrient environments, p. 67-80.
- Alexander, M. (1980). Introducción A La Microbiología Del Suelo. 631: 46-54.
- Al-Karaki, G., McMichael, B.J., Zak, J. (2004). Field response of wheat to arbuscular mycorrhizal fungi and drought stress. *Mycorrhiza*, 14(4), 263-269.
- Allen, M.F., Richards, J.H., Busso, C. A. (1989). Influence of clipping and soil water status on vesicular-arbuscular mycorrhizae of two semi-arid tussock grasses. *Biology and Fertility of Soils*, 8(4), 285-289.
- Allison, S.D., Vitousek, P.M. (2005). Responses of extracellular enzymes to simple and complex nutrient inputs. *Soil Biology and Biochemistry*, 37(5), 937-944.
- Allison, V.J., Yermakov, Z., Miller, R.M., Jastrow, J.D., Matamala, R. (2007). Using landscape and depth gradients to decouple the impact of correlated environmental variables on soil microbial community composition. *Soil Biology and Biochemistry*, 39(2), 505-516.
- Allison, S.D., Martiny, J.B. (2008). Resistance, resilience, and redundancy in microbial communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(Supplement 1), 11512-11519.
- Allsopp, N. (1998). Effect of defoliation on the arbuscular mycorrhizas of three perennial pasture and rangeland grasses. *Plant and Soil*, 202(1), 117-124.
- Alster, C.J., German, D.P., Lu, Y., Allison, S.D. (2013). Microbial enzymatic responses to drought and to nitrogen addition in a southern California grassland. *Soil Biology and Biochemistry*, 64, 68-79.
- Althabegoiti, M.J., López, F., Mongiardini, E.J., Pérez Giménez, J., Quelas, J. I., Lopez García, S.L., Lodeiro, A.R. (2007). Colonización rizosférica: movilidad y distribución de rizobacterias en el suelo y su interacción con las plantas. En: *De la biología del suelo a la Agricultura* (Thuar A., Cassán F., Olmedo C. Compiladores). UNRC. Argentina. 33-49.
- Ambrosino, M.L., Cabello, M.N., Busso, C.A., Velázquez, M.S., Torres, Y.A., Cardillo, D.S., Rodriguez, G. (2018). Communities of arbuscular mycorrhizal fungi associated with perennial grasses of different forage quality exposed to defoliation. *Journal of Arid Environments*, 154, 61-69.
- Ambrosino, M.L., Busso, C.A., Cabello, M.N., Velázquez, M.S., Torres, Y.A., Ithurrt, L.S., Palomo, I. R. (2020). Total and structure colonization by arbuscular mycorrhizal fungi in native, perennial grasses of different forage quality exposed to defoliation. *Journal of King Saud University-Science*, 32(1), 377-383.
- Anderson, T.H., Domsch, K.H., (1986). Carbon link between microbial biomass and soil organic matter. In: Megusar, F., Gantar, M. (Eds.), *Perspectives in Microbial Ecology*. Slovene Society for Microbiology, Ljubljana, Mladinska knjiga, pp. 467–471.
- Anderson, T.H., Domsch, K.H., (1990). Application of eco-physiological quotients (qCO<sub>2</sub> and qD) on microbial biomasses from soils of different cropping histories. *Soil Biology and Biochemistry*, 22(2), 251-255.
- Anderson, T.H., Domsch, K.H. (1993). The metabolic quotient for CO<sub>2</sub> (qCO<sub>2</sub>) as a specific activity parameter to assess the effects of environmental conditions, such as pH, on the microbial biomass of forest soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 25(3), 393-395.

- Anderson, T. H. (2003). Microbial eco-physiological indicators to asses soil quality. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 98(1-3), 285-293.
- Andrade, G., Mihara, K. L., Linderman, R. G., Bethlenfalvay, G. J. (1997). Bacteria from rhizosphere and hyphosphere soils of different arbuscular-mycorrhizal fungi. *Plant and soil*. 192(1): 71-79.
- Andrade, M., Suárez, D., Peri, P. L., Borrelli, P., Ormaechea, S., Ferrante, D., Rivera, E., Sturzenbaum, M. V. (2015). Desarrollo de un modelo de asignación variable de carga animal en Patagonia Sur. Ediciones INTA, Río Gallegos, Santa Cruz :ISBN 978-987-521-592-4.
- Anton, A. M. R., Zuloaga, F. O., Al-Shehbaz, I. A., Barboza, G. E., Belgrano, M. J., Freire, S. E., Múlgura, M. E. (2012). Flora Argentina: flora vascular de la República Argentina. Instituto de Botánica Darwinion. Consulta (año 2016) on-line <http://www.floraargentina.edu.ar>.
- Araújo, A.D., Santos, V.B., Monteiro, R.T.R. (2008). Responses of soil microbial biomass and activity for practices of organic and conventional farming systems in Piauí state, Brazil. *European Journal of Soil Biology*, 44(2), 225-230.
- Araújo, A., Leite, L., Santos, V., Carneiro, R., (2009). Soil microbial activity in conventional and organic agricultural systems. *Sustainability*, 1(2), 268-276.
- Arias, N. M. M., Ricalde, S. L. C., Sánchez, R. G., & Ata, A. M. (Eds.). (2008). Micorrizas arbusculares en ecosistemas áridos y semiáridos. Mundi Prensa.
- Ash A. J., Mcivor J. G. (1998). How season of grazing and herbivore selectivity influence monsoon tall-grass communities of northern Australia. *J. Veg. Sci.* 9: 123-132.
- Ashman, M. R., Hallett, P. D., Brookes, P. C., Allen, J. (2009). Evaluating soil stabilisation by biological processes using step-wise aggregate fractionation. *Soil and Tillage Research*, 102(2), 209-215.
- Augustine, D.J., McNaughton, S.J. (1998). Ungulate effects on the functional species composition of plant communities: herbivore selectivity and plant tolerance. *Journal of Wildlife Management* 62:1165–1183.
- Augustine, D. J., Derner, J. D., Milchunas, D., Blumenthal, D., Porensky, L. M. (2017). Grazing moderates increases in C3 grass abundance over seven decades across a soil texture gradient in shortgrass steppe. *Journal of Vegetation Science*, 28(3), 562-572.
- Austin, A.T., Yahdjian, L., Stark, J.M., Belnap, J., Porporato, A., Norton, U., Damián A.R., Schaeffer, S.M. (2004). Water pulses and biogeochemical cycles in arid and semiarid ecosystems. *Oecologia*, 141(2), 221-235.
- Ayarbe, J.P., Kieft, T.L. (2000). Mammal mounds stimulate microbial activity in a semiarid shrubland. *Ecology*, 81(4), 1150-1154.
- Báez, S., Collins, S. L., Pockman, W. T., Johnson, J. E., Small, E. E. (2013). Effects of experimental rainfall manipulations on Chihuahuan Desert grassland and shrubland plant communities. *Oecologia*, 172(4), 1117-1127.
- Bagchi, S., Ritchie, M.E. (2010). Herbivore effects on above-and belowground plant production and soil nitrogen availability in the Trans-Himalayan shrub-steppes. *Oecologia*, 164(4), 1075-1082.
- Bailey, D. W., Brown, J. R. (2011). Rotational grazing systems and livestock grazing behavior in shrub-dominated semi-arid and arid rangelands. *Rangeland Ecology & Management*, 64(1), 1-9.
- Bais, H. P., Weir, T. L., Perry, L. G., Gilroy, S., Vivanco, J. M. (2006). The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 57, 233-266.



- Bandick, A. K., Dick, R. P. (1999). Field management effects on soil enzyme activities. *Soil Biology and Biochemistry*, 31(11), 1471-1479.
- Bardgett, R., Leemans, D. (1996). Soil microbial activity on exposed mountain ridges in Snowdonia (Eryri), North Wales. *Soil Biology and Biochemistry*, 28(10-11), 1533-1536.
- Bardgett, R. D., Leemans, D. K., Cook, R., Hobbs, P. J. (1997). Seasonality of the soil biota of grazed and ungrazed hill grasslands. *Soil Biology and Biochemistry*, 29(8): 1285-1294.
- Bardgett, R. D., Wardle, D. A., Yeates, G. W. (1998). Linking above-ground and below-ground interactions: how plant responses to foliar herbivory influence soil organisms. *Soil Biology and Biochemistry* 30: 1867–1878.
- Bardgett, R. D., McAlister, E. (1999). The measurement of soil fungal: bacterial biomass ratios as an indicator of ecosystem self-regulation in temperate meadow grasslands. *Biology and Fertility of Soils*, 29(3), 282-290.
- Bardgett, R.D., Jones, A.C., Jones, D.L., Kemmitt, S.J., Cook, R., Hobbs, P.J. (2001). Soil microbial community patterns related to the history and intensity of grazing in sub-montane ecosystems. *Soil Biology and Biochemistry*, 33(12-13), 1653-1664.
- Bardgett, R. D., Streeter, T. C., Cole, L., Hartley, I. R. (2002). Linkages between soil biota, nitrogen availability, and plant nitrogen uptake in a mountain ecosystem in the Scottish Highlands. *Applied Soil Ecology*, 19(2), 121-134.
- Barea, J. M., Palenzuela, J., Cornejo, P., Sánchez-Castro, I., Navarro-Fernández, C., López-García, A., Azcón-Aguilar, C. (2011). Ecological and functional roles of mycorrhizas in semi-arid ecosystems of Southeast Spain. *Journal of arid environments*, 75(12), 1292-1301.
- Barroetaveña, C., Rajchenberg, M., Cázares, E. (2005). Mycorrhizal fungi in *Pinus ponderosa* introduced in Central Patagonia (Argentina). *Nova Hedwigia*, 80(3-4), 453-464.
- Barto, E. K., Rillig, M. C. (2010). Does herbivory really suppress mycorrhiza? A meta-analysis. *Journal of Ecology*, 98(4), 745-753.
- Bell, C. W., Tissue, D. T., Loik, M. E., Wallenstein, M. D., Acosta-Martinez, V., Erickson, R. A., Zak, J. C. (2014). Soil microbial and nutrient responses to 7 years of seasonally altered precipitation in a Chihuahuan Desert grassland. *Global change biology*, 20(5), 1657-1673.
- Belsky, A. J., Mworonga, S. M., Amundson, R. G., Duxbury, J. M., Ali, A. R. (1993). Comparative effects of isolated trees on their undercanopy environment in high- and low-rainfall savannas. *Journal Appl. Ecology*. 30: 143-155.
- Bending, G., Putland, C., Rayns, F. (2000). Changes in microbial community metabolism and labile organic matter fractions as early indicators of the impact of management on soil biological quality. *Biol. Fertil. Soils*. 31: 78-84.
- Bertiller, M.B., Bisigato, A.J., Carrera, A.L., Del Valle, H.F. (2004). Estructura de la vegetación y funcionamiento de los ecosistemas del Monte Chubutense. *Bol. Soc. Argent. Bot*, 39(3-4), 139-158.
- Bertiller, M. B., Sain, C. L., Carrera, A. L., Vargas, D. N. (2005). Patterns of nitrogen and phosphorus conservation in dominant perennial grasses and shrubs across an aridity gradient in Patagonia, Argentina. *Journal of Arid Environments*, 62(2), 209-223.
- Bethlenfalvay, G. J. Dakessian, S. (1984). Grazing effects on mycorrhizal colonization and floristic composition of the vegetation on a semiarid range in Northern Nevada. *Journal of Range Management* 37: 312–316.

- Bethlenfalvay, G. J., Evans, R. A., Lesperance, A. L. (1985). Mycorrhizal colonization of crested wheatgrass as influenced by grazing. *Agronomy Journal* 77: 233 -236.
- Billoni, S. L., Peri, P. L., Bahamonde, H. A. (2016). Response of vegetation to management by cuttings along strips in a *Mulguraea tridens* shrubland in southern Patagonia. *Ecologia Austral*, 26(03), 293-304.
- Bisigato, A.J., Bertiller, M.B. (2004). Temporal and micro-spatial patterning of seedling establishment. Consequences for patch dynamics in the southern Monte, Argentina. *Plant Ecology*, 174(2), 235-246.
- Blanke, V., Renker, C., Wagner, M., Füllner, K., Held, M., Kuhn, A. J., Buscot, F. (2005). Nitrogen supply affects arbuscular mycorrhizal colonization of *Artemisia vulgaris* in a phosphate-polluted field site. *New Phytologist*, 166(3), 981-992.
- Bolton Jr, H., Smith, J.L., Link, S.O. (1993). Soil microbial biomass and activity of a disturbed and undisturbed shrub-steppe ecosystem. *Soil Biology and Biochemistry*. 25(5). 545-552.
- Borrelli, P., Oliva, G. (2001). Ganadería ovina sustentable en la Patagonia Austral. Tecnología de manejo extensivo. Ediciones INTA, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, 1-281.
- Bradford, M. A., Keiser, A. D., Davies, C. A., Mersmann, C. A., Strickland, M. S. (2013). Empirical evidence that soil carbon formation from plant inputs is positively related to microbial growth. *Biogeochemistry*, 113(1-3), 271-281.
- Braunack, M. V., Walker, J. (1985). Recovery of some surface soil properties of ecological interest after sheep grazing in a semi-arid woodland. *Aust. J. Ecol.* 10: 451-460.
- Brewer, T. E., Handley, K. M., Carini, P., Gilbert, J. A., & Fierer, N. (2016). Genome reduction in an abundant and ubiquitous soil bacterium 'Candidatus Udaeobacter copiosus'. *Nature Microbiology*, 2(2), 1-7.
- Briggs, J.M., Knapp, A.K. (1995). Interannual variability in primary production in tallgrass prairie: climate, soil moisture, topographic position, and fire as determinants of aboveground biomass. *American Journal of Botany*, 82(8), 1024-1030.
- Briske, D. D., Richards, J. H. (1995). Plant responses to defoliation: a physiological, morphological and demographic evaluation. *Wildland plants: physiological ecology and developmental morphology*, 635-710.
- Briske, D. D., Derner, J. D., Brown, J. R., Fuhlendorf, S. D., Teague, W. R., Havstad, K. M., Willms, W. D. (2008). Rotational grazing on rangelands: reconciliation of perception and experimental evidence. *Rangeland Ecology & Management*, 61(1), 3-17.
- Bristow, A. W., Jarvis, S. C. (1991). Effects of grazing and nitrogen fertiliser on the soil microbial biomass under permanent pasture. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 54: 9-21.
- Brock, T. D., Smith, D. W., Madigan, M. T. (1984). *Biology of microorganisms*, fourth ed., Prentice-Hall, Englewood Cliffs pp. 847.
- Brodie, E., Edwards, S., Clipson, N. (2002). Bacterial community dynamics across a floristic gradient in a temperate upland grassland ecosystem. *Microbial ecology*, 44(3), 260-270.
- Brookes, P. C., Ocio, J. A., Wu, J. (1990). The Soil Microbial Biomass: Its Measurement, Properties And Role In Soil Nitrogen And Carbon Dynamics Following Substrate Incorporation. 35:39-51.
- Brookes, P.C. (1995). The use of microbial parameters in monitoring soil pollution by heavy metals. *Biol. Fertil. Soils* 19: 269-279.

- Brueck, H., Erdle, K., Gao, Y., Giese, M., Zhao, Y., Peth, S., Lin, S. (2010). Effects of N and water supply on water use-efficiency of a semiarid grassland in Inner Mongolia. *Plant and Soil*, 328(1-2), 495-505.
- Brundrett, M. C. (1991). Mycorrhizas in natural ecosystems. *Advances in Ecological Research* 21: 171–313.
- Brundrett, M. C. (2002). Coevolution of roots and mycorrhizas of land plants. *New phytologist*, 154(2), 275-304.
- Brundrett, M. C. (2004). Diversity and classification of mycorrhizal associations. *Biological Reviews*. 79(3): 473-495.
- Buckley, D.H., Schmidt, T.M. (2001). The structure of microbial communities in soil and the lasting impact of cultivation. *Microbial ecology*, 42(1), 11-21.
- Burrows, R. L., Pfleger, F. L. (2002). Arbuscular mycorrhizal fungi respond to increasing plant diversity. *Canadian Journal of Botany*, 80(2), 120-130.
- Buscot, F., Varma, A. (2005). Microorganisms in soils: roles in genesis and functions (pp. 139-153). (Ed.). Germany: Springer.
- Carrera, A.L., Bertiller, M.B. (2010). Relationships among plant litter, fine roots, and soil organic C and N across an aridity gradient in northern Patagonia, Argentina. *Ecoscience*, 17(3), 276-286.
- Cavagnaro, R.A., Ripoll, M.P., Godeas, A., Oesterheld, M., Grimoldi, A.A. (2017). Patchiness of grass mycorrhizal colonization in the Patagonian steppe. *Journal of Arid Environments* 137, 46–49.
- Cavagnaro, R. A., Pero, E., Dudinszky, N., Golluscio, R. A., Grimoldi, A. A. (2019). Under pressure from above: overgrazing decreases mycorrhizal colonization of both preferred and unpreferred grasses in the Patagonian steppe. *Fungal Ecology*, 40, 92-97.
- Chapin, F. S., Matson, P. A., Mooney, H. A. (2002). Principles of terrestrial ecosystem ecology. Springer-Verlag, New York. 436 pp.
- Chen, D., Mi, J., Chu, P., Cheng, J., Zhang, L., Pan, Q. Bai, Y. (2015). Patterns and drivers of soil microbial communities along a precipitation gradient on the Mongolian Plateau. *Landscape Ecology*, 30(9), 1669-1682.
- Chigineva, N.I., Aleksandrova, A.V., Tiunov, A.V. (2009). The Addition of labile carbon alters litter fungal communities and decreases litter decomposition rates. *Applied Soil Ecology*, 42(3), 264-270.
- Chu, H., Lin, X., Fujii, T., Morimoto, S., Yagi, K., Hu, J., Zhang, J. (2007). Soil microbial biomass, dehydrogenase activity, bacterial community structure in response to long-term fertilizer management. *Soil Biology and Biochemistry*, 39(11), 2971-2976.
- Cibils, A. F., Coughenour, M. B., Gallegos, S. C. (2001). Impact of grazing management on the productivity of cold temperate grasslands of Southern Patagonia-a critical assessment. In *International Grassland Congress*. 19. 2001 02 11-21, 11-21 de febrero, 2001. Sao Pedro, Sao Paulo. BR.
- Cibils, A. F., Borrelli, P. R. (2005). Grasslands of Patagonia. in: Suttie, J.M., Reynolds, S.G., Batello, C. (Eds.). *Grasslands of the World*. FAO, Rome. pp. 121–170.
- Cinnadurai, C., Gopalaswamy, G., Balachandar, D. (2013). Diversity of cultivable *Azotobacter* in the semi-arid alfisol receiving long-term organic and inorganic nutrient amendments. *Annals of microbiology*, 63(4), 1397-1404.
- Cipriotti, P.A., Aguiar, M. (2005). Effects of grazing on patch structure in a semi-arid two-phase vegetation mosaic. *J. Veg. Sci.* 16, 57-66.

- Cleveland, C. C., Townsend, A. R., Schmidt, S. K. (2002). Phosphorus limitation of microbial processes in moist tropical forests: evidence from short-term laboratory incubations and field experiments. *Ecosystems* 5:680–691
- Cleveland, C. C., Townsend, A. R. (2006). Nutrient additions to a tropical rain forest drive substantial soil carbon dioxide losses to the atmosphere. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 103:16–21.
- Collins, S. L., Sinsabaugh, R. L., Crenshaw, C., Green, L., Porras-Alfaro, A., Stursova, M., Zeglin, L. H. (2008). Pulse dynamics and microbial processes in aridland ecosystems. *Journal of Ecology*, 96(3), 413-420.
- Cookson, W. R., Osman, M., Marschner, P., Abaye, D. A., Clark, I., Murphy, D. V., Watson, C. A. (2007). Controls on soil nitrogen cycling and microbial community composition across land use and incubation temperature. *Soil Biology and Biochemistry*, 39(3), 744-756.
- Coronato, F. R., Bertiller, M. B. (1996). Precipitation and landscape related effects on soil moisture in semi-arid rangelands of Patagonia. *Journal of Arid Environments*, 34(1), 1-9.
- Costanza, R., d'Arge, R., De Groot, R., Farber, S., Grasso, M., Hannon, B., Raskin, R. G. (1997). The value of the world's ecosystem services and natural capital. *nature*, 387(6630), 253-260.
- Courty, P. E., Franc, A., Pierrat, J. C., & Garbaye, J. (2008). Temporal changes in the ectomycorrhizal community in two soil horizons of a temperate oak forest. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(18), 5792-5801.
- Craine, J.M., Morrow, C., Fierer, N. (2007). Microbial nitrogen limitation increases decomposition. *Ecology*, 88(8), 2105-2113.
- Crawford, M.C., Grace, P.R., Oades, J.M. (2000). Allocation of carbon to shoots, roots, soil and rhizosphere respiration by barrel medic (*Medicago truncatula*) before and after defoliation. *Plant Soil* 227: 67–75.
- Csonka, L. N. (1989). Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 53(1), 121-147.
- Cui, X., Wang, Y., Niu, H., Wu, J., Wang, S., Schnug, E., Tang, Y. (2005). Effect of long-term grazing on soil organic carbon content in semiarid steppes in Inner Mongolia. *Ecological Research*, 20(5), 519-527.
- Cui, J., Holden, N. M. (2015). The relationship between soil microbial activity and microbial biomass, soil structure and grassland management. *Soil and Tillage Research*, 146, 32-38.
- Daniels, B. A., Trappe, J. M. (1980). Factors affecting spore germination of the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus, *Glomus epigaeus*. *Mycologia*, 72(3), 457-471.
- Davison, J., Moora, M., Öpik, M., Ainsaar, L., Ducousso, M., Hiiesalu, I., Koorem, K. (2018). Microbial island biogeography: isolation shapes the life history characteristics but not diversity of root-symbiotic fungal communities. *The ISME journal*, 12(9), 2211-2224.
- Davison, J., García de León, D., Zobel, M., Moora, M., Bueno, C. G., Barceló, M., Sepp, S. K. (2020). Plant functional groups associate with distinct arbuscular mycorrhizal fungal communities. *New Phytologist*, 226(4), 1117-1128.
- Dawson, L. A., Grayston, S. J., Paterson, E. (2000). Effects of grazing on the roots and rhizosphere of grasses. *Grassland ecophysiology and grazing ecology*, 61-84.
- De Vries, F.T., Hoffland, E., van Eekeren, N., Brussaard, L., Bloem, J. (2006). Fungal/bacterial ratios in grasslands with contrasting nitrogen management. *Soil Biology and Biochemistry*, 38(8), 2092-2103.

- Deepika, S., Kothamasi, D. (2015). Soil moisture—a regulator of arbuscular mycorrhizal fungal community assembly and symbiotic phosphorus uptake. *Mycorrhiza*, 25(1), 67-75.
- del Mar Alguacil, M., Torres, M. P., Montesinos-Navarro, A., Roldán, A. (2016). Soil characteristics driving arbuscular mycorrhizal fungal communities in semiarid Mediterranean soils. *Applied and environmental microbiology*, 82(11), 3348-3356.
- Del Valle, H. F., Eiden, G., Mensching, H., Goergen, J. (1995). Evaluación del estado actual de la desertificación en áreas representativas de la Patagonia. Informe Final Fase I. Proyecto de Cooperación Técnica argentino-alemana, proyecto INTA-GTZ, Lucha contra la Desertificación en la Patagonia a través de un sistema de Monitoreo Ecológico. INTA, Buenos Aires.
- Delgado-Baquerizo, M., Maestre, F. T., Reich, P. B., Trivedi, P., Osanai, Y., Liu, Y. R., Singh, B. K. (2016). Carbon content and climate variability drive global soil bacterial diversity patterns. *Ecological Monographs*, 86(3), 373-390.
- Delgado-Baquerizo, M., Oliverio, A. M., Brewer, T. E., Benavent-González, A., Eldridge, D. J., Bardgett, R. D., Fierer, N. (2018). A global atlas of the dominant bacteria found in soil. *Science*, 359(6373), 320-325.
- Dennis, P.G., Miller, A.J., Hirsch, P.R. (2010). Are root exudates more important than other sources of rhizodeposits in structuring rhizosphere bacterial communities?. *FEMS microbiology ecology*, 72(3), 313-327.
- Denton, E. M., Smith, B. S., Hamerlynck, E. P., Sheley, R. L. (2018). Seedling defoliation and drought stress: variation in intensity and frequency affect performance and survival. *Rangeland Ecology & Management*, 71(1), 25-34.
- Derner, J. D., Schuman, G. E. (2007). Carbon sequestration and rangelands: a synthesis of land management and precipitation effects. *Journal of soil and water conservation*, 62(2), 77-85.
- Deveautour, C., Donn, S., Power, S. A., Bennett, A. E., Powell, J. R. (2018). Experimentally altered rainfall regimes and host root traits affect grassland arbuscular mycorrhizal fungal communities. *Molecular ecology*, 27(8), 2152-2163.
- Di Rienzo, J. A., Casanoves, F., Balzarini, M. G., Gonzalez, L., Tablada, M., Robledo, C. W. (2013). Infostat Versión 2013. Córdoba, Argentina: Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba.
- Diaz, S., Lavorel, S., McIntyre, S. U. E., Falczuk, V., Casanoves, F., Milchunas, D. G., Landsberg, J. (2007). Plant trait responses to grazing—a global synthesis. *Global Change Biology*, 13(2), 313-341.
- Dick, R. (1994). "Soil enzyme activities as indicators of soil quality". En: Doran J. W., Coleman D. C., Bezdicsek D. F. & Stewart B. A. (eds.), *Defining soil quality for a sustainable environment*. SSSA Spec Pub.Nº 35, Madison, pp 107-124.
- Dick, R. P., Rasmussen, P. E., Kerle, E. A. (1988). Influence of long-term residue management on soil enzyme activities in relation to soil chemical properties of a wheat-fallow system. *Biology and Fertility of Soils*, 6(2), 159-164.
- Diehl, P., Fontenla, S. (2010). Arbuscular mycorrhizal infection in two morphological root types of *Araucaria araucana* (Molina) K. Koch.
- Dietrich, P., Buchmann, T., Cesarz, S., Eisenhauer, N., Roscher, C. (2017). Fertilization, soil and plant community characteristics determine soil microbial activity in managed temperate grasslands. *Plant and Soil*, 419(1-2), 189-199.
- Doran, J. W., Parkin, T. B. (1994). Defining and assensing soil quality. In: *Defining Soil Quality for a Sustainable Environment*. SSSA. Special Publication Nº 35.

- Dube, F., Zagal, E., Stolpe, N., Espinosa, M. (2009). The influence of land-use change on the organic carbon distribution and microbial respiration in a volcanic soil of the Chilean Patagonia. *Forest Ecology and Management*, 257(8), 1695-1704.
- Dudinszky, N., Cabello, M. N., Grimoldi, A. A., Schalamuk, S., Golluscio, R. A. (2019). Role of Grazing Intensity on Shaping Arbuscular Mycorrhizal Fungi Communities in Patagonian Semiarid Steppes. *Rangeland ecology & management*, 72(4), 692-699.
- Duran, B. E., Duncan, D. S., Oates, L. G., Kucharik, C. J., Jackson, R. D. (2016). Nitrogen fertilization effects on productivity and nitrogen loss in three grass-based perennial bioenergy cropping systems. *PloS one*, 11(3), e0151919.
- Edgerton, D. L., Harris, J. A., Birch, P., Bullock, P. (1995). Linear relationship between aggregate stability and microbial biomass in three restored soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 27(11): 1499-1501.
- Egan, C., Li, D. W., Klironomos, J. (2014). Detection of arbuscular mycorrhizal fungal spores in the air across different biomes and ecoregions. *Fungal Ecology*, 12, 26-31.
- Egan, G., Zhou, X., Wang, D., Jia, Z., Crawley, M.J., Fornara, D. (2018). Long-term effects of grassland management on soil microbial abundance: implications for soil carbon and nitrogen storage. *Biogeochemistry*, 141(2), 213-228.
- Eivazi, F., Bayan, M. R., Schmidt, K. (2003). Select soil enzyme activities in the historic Sanborn Field as affected by long-term cropping systems. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 34(15-16), 2259-2275.
- Eivazi, F., Bayan, M. R., Schmidt, K. (2003). Select soil enzyme activities in the historic Sanborn Field as affected by long-term cropping systems. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 34(15-16), 2259-2275.
- Eldridge, D. J., Poore, A. G., Ruiz-Colmenero, M., Letnic, M., Soliveres, S. (2016). Ecosystem structure, function, and composition in rangelands are negatively affected by livestock grazing. *Ecological Applications*, 26(4), 1273-1283.
- Emmerling, C., Schlöter, M., Hartmann, A., Kandeler, E. (2002). Functional diversity of soil organisms—a review of recent research activities in Germany. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 165(4), 408-420.
- Eom, A. H., Wilson, G. W., Hartnett, D. C. (2001). Effects of ungulate grazers on arbuscular mycorrhizal symbiosis and fungal community structure in tallgrass prairie. *Mycologia*, 93(2), 233-242.
- Estiarte, M., Vicca, S., Peñuelas, J., Bahn, M., Beier, C., Emmett, B. A., Kröel-Dulay, G. (2016). Few multiyear precipitation–reduction experiments find a shift in the productivity–precipitation relationship. *Global change biology*, 22(7), 2570-2581.
- Fagbola, O., Osonubi, O., Mulongoy, K., Odunfa, S. (2001). Effects of drought stress and arbuscular mycorrhiza on the growth of *Gliricidia sepium* (Jacq.) Walp, and *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit. in simulated eroded soil conditions. *Mycorrhiza*, 11(5), 215-223.
- Fan, F., Liang, C., Tang, Y., Harker-Schuch, I., Porter, J. R. (2019). Effects and relationships of grazing intensity on multiple ecosystem services in the Inner Mongolian steppe. *Science of the Total Environment*, 675, 642-650.
- Fan, J. W., Solaiman, Z. M., Mickan, B. S., Du, Y. L., Li, F. M., Abbott, L. K. (2019). Sequential defoliation impacts on colonisation of roots of *Lolium rigidum* by arbuscular mycorrhizal fungi were primarily determined by root responses. *Biology and Fertility of Soils*, 55(8), 789-800.

- FAO, IFAD, and WFP. (2015). The state of food insecurity in the world 2015: meeting the 2015 international hunger targets: taking stock of uneven progress. Rome: McGuire, S. (2015).
- Fernández, N., Fontenla, S., Messuti, M. I. (2010). Mycorrhizal status of obligate and facultative epiphytic ferns in a Valdivian temperate forest of Patagonia, Argentina. *American Fern Journal*, 100(1), 16-26.
- Fernández, N., Fontenla, S., Messuti, M. I. (2012). Co-occurrence of arbuscular mycorrhizas and dark septate endophytes in pteridophytes from a Valdivian Temperate Rainforest in Patagonia, Argentina. *Mycorrhiza: Occurrence in Natural and Restored Environments*; Pagano, M., Ed, 99-126.
- Ferrante, D., Cesa, A., Lewis, S., Jaurena, G. (2014). Is *Poa spiciformis* tolerant to defoliation? Defoliation effects on its productive performance. *Phyton, International Journal of Experimental Botany*, 83(1), 127-131.
- Ferrante, D., Oliva, G. E., Fernández, R. J. (2014). Soil water dynamics, root systems, and plant responses in a semiarid grassland of Southern Patagonia. *Journal of Arid Environments*, 104, 52-58.
- Ferraro, D. O., Oosterheld, M. (2002). Effect of defoliation on grass growth. A quantitative review. *Oikos*, 98(1), 125-133.
- Fierer, N., Schimel, J. P., Holden, P. A. (2003). Influence of drying–rewetting frequency on soil bacterial community structure. *Microbial ecology*, 45(1), 63-71.
- Fierer, N., Schimel, J. P. (2003). A proposed mechanism for the pulse in carbon dioxide production commonly observed following the rapid rewetting of a dry soil. *Soil Science Society of America Journal*, 67(3): 798-805.
- Fierer, N., Jackson, J.A., Vilgalys, R., Jackson, R.B. (2005). Assessment of soil microbial community structure by use of taxon-specific quantitative PCR assays. *Appl. Environ. Microbiology*, 71(7), 4117-4120. doi: 10.1128/AEM.71.7.4117-4120.2005.
- Fierer, N., Jackson, R. B. (2006). The diversity and biogeography of soil bacterial communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(3), 626-631.
- Flemmer, A. C., Busso, C. A., Fernandez, O. A., Montani, T. (2002). Root growth, appearance and disappearance in perennial grasses: Effects of the timing of water stress with or without defoliation. *Canadian Journal of Plant Science*, 82(3), 539-547.
- Fontaine, S., Bardoux, G., Abbadie, L., Mariotti, A. (2004). Carbon input to soil may decrease soil carbon content. *Ecology letters*, 7(4), 314-320.
- Fontenla, S., Puntieri, J., Ocampo, J. A. (2001). Mycorrhizal associations in the Patagonian steppe, Argentina. *Plant and Soil* 233: 13-29.
- Ford, H., Rousk, J., Garbutt, A., Jones, L., Jones, D.L. (2013). Grazing effects on microbial community composition, growth and nutrient cycling in salt marsh and sand dune grasslands. *Biology and fertility of soils*, 49(1), 89-98.
- Francis, R., Read, D. J. (1995). Mutualism and antagonism in the mycorrhizal symbiosis, with special reference to impacts on plant community structure. *Canadian Journal of Botany* 73(Supplement 1): S1301-S1309.
- Franzluebbers, A.J., Hons, F.M., Zuberer, D.A. (1995). Soil organic carbon, microbial biomass, and mineralizable carbon and nitrogen in sorghum. *Soil Science Society of America Journal*, 59(2), 460-466.
- Franzluebbers, A.J., Haney, R.L., Honeycutt, C.W., Arshad, M.A., Schomberg, H.H., Hons, F.M. (2001). Climatic influences on active fractions of soil organic matter. *Soil Biology and Biochemistry*, 33(7-8), 1103-1111.

- Fuchslueger, L., Bahn, M., Fritz, K., Hasibeder, R. Richter, A. (2014). Experimental drought reduces the transfer of recently fixed plant carbon to soil microbes and alters the bacterial community composition in a mountain meadow. *New Phytologist*, 201, 916– 927.
- Garbaye, J. (1991). Biological interactions in the mycorrhizosphere. *Experientia*. 47(4):370-375.
- Garbisu, C., Alkorta, I., Epelde, L. (2011). Assessment of soil quality using microbial properties and attributes of ecological relevance. *Applied Soil Ecology*. 4: 1-4.
- García Izquierdo, C., Gil Sotres, F., Hernández Fernández, T., Trasar Cepeda, C. (2003). Técnicas de análisis de parámetros bioquímicos en suelos: medida de actividades enzimáticas y biomasa microbiana. Ediciones Mundi-Prensa. España.
- García, I., Mendoza, R., Pomar, M. C. (2012). Arbuscular mycorrhizal symbiosis and dark septate endophytes under contrasting grazing modes in the Magellanic steppe of Tierra del Fuego. *Agriculture, ecosystems & environment*, 155, 194-201.
- Garner, W., Steinberger, Y. (1989). A proposed mechanism for the formation of 'fertile islands' in the desert ecosystem. *Journal of arid Environments*, 16(3), 257-262.
- Garrido, E., Bennett, A. E., Fornoni, J., Strauss, S. Y. (2010). Variation in arbuscular mycorrhizal fungi colonization modifies the expression of tolerance to above-ground defoliation. *Journal of Ecology*, 98(1), 43-49.
- Gehring, C. A., Whitham, T. G. (1994). Interactions between aboveground herbivores and the mycorrhizal mutualists of plants. *Trends in Ecology & Evolution*, 9(7), 251-255.
- Gehring, C. A., Whitham, T. G. (2002). Mycorrhizae-herbivore interactions: population and community consequences. In: van der Heijden MG, Sanders I (Eds.). *Mycorrhizal ecology*. Berlín: Springer-Verlag. pp. 295–320.
- Gehring, C. A., Swaty, R. L., Deckert, R. J. (2017). Mycorrhizas, drought, and host-plant mortality. In *Mycorrhizal Mediation of Soil* (pp. 279-298). Elsevier.
- Geisseler, D., Horwath, W. R. (2009). Short-term dynamics of soil carbon, microbial biomass, and soil enzyme activities as compared to longer-term effects of tillage in irrigated row crops. *Biology and Fertility of Soils*, 46(1), 65-72.
- Geng, S. M., Yan, D. H., Zhang, T. X., Weng, B. S., Zhang, Z. B., Qin, T. L. (2015). Effects of drought stress on agriculture soil. *Natural Hazards*, 75(2), 1997-2011.
- Geyer, K. M., Kyker-Snowman, E., Grandy, A. S., Frey, S. D. (2016). Microbial carbon use efficiency: accounting for population, community, and ecosystem-scale controls over the fate of metabolized organic matter. *Biogeochemistry*, 127(2-3), 173-188.
- Gherardi, L.A., Sala, O.E., Yahdjian, L. (2013). Preference for different inorganic nitrogen forms among plant functional types and species of the Patagonian steppe. *Oecologia* 173, 1075e1081
- Giacometti, C., Demyan, M. S., Cavani, L., Marzadori, C., Ciavatta, C., Kandeler, E. (2013). Chemical and microbiological soil quality indicators and their potential to differentiate fertilization regimes in temperate agroecosystems. *Applied Soil Ecology*, 64, 32-48.
- Gianinazzi, S., Gollotte, A., Binet, M. N., van Tuinen, D., Redecker, D., Wipf, D. (2010). Agroecology: the key role of arbuscular mycorrhizas in ecosystem services. *Mycorrhiza*, 20(8), 519-530.



- Gibson-Roy, P., McLean, C., Delpratt, J. C., Moore, G. (2014). Do arbuscular mycorrhizal fungi recolonize revegetated grasslands?. *Ecological Management & Restoration*, 15(1), 87-91.
- Giovannetti, M., Sbrana, C., Avio, L., Strani, P. (2004). Patterns of below-ground plant interconnections established by means of arbuscular mycorrhizal networks. *New Phytologist*, 164(1), 175-181.
- Girvan, M.S., Bullimore, J., Pretty, J.N., Osborn, A.M., Ball, A.S. (2003). Soil type is the primary determinant of the composition of the total and active bacterial communities in arable soils. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69(3), 1800-1809.
- Goberna, M., Pascual, J.A., Garcia, C., Sánchez, J. (2007). Do plant clumps constitute microbial hotspots in semiarid Mediterranean patchy landscapes?, *Soil Biology and Biochemistry*, 39(5), 1047-1054.
- Godley, A. R. (2004). Factors affecting the soil microbial quality measurements of biomass quotient and respiration quotient. *Water and Environment Journal*, 18(2), 73-79.
- Golluscio, R. A., Deregibus, V. A., Paruelo, J. M. (1998). Sustainability and range management in the Patagonian steppes. *Ecología Austral*, 8(02), 265-284.
- Golluscio, R.A., Austin, A.T., García Martínez, G.C., Gonzalez-Polo, M., Sala, O.E., Jackson, R.B. (2009). Sheep grazing decreases organic carbon and nitrogen pools in the Patagonian steppe: combination of direct and indirect effects. *Ecosystems* 12, 686-697.
- González, M. H. (2013). Some indicators of interannual rainfall variability in Patagonia (Argentina). *Climate Variability–Regional and Thematic Patterns*, 133-161.
- Gonzalez-Polo, M., Austin, A. T. (2009). Spatial heterogeneity provides organic matter refuges for soil microbial activity in the Patagonian steppe, Argentina. *Soil Biology and Biochemistry*, 41(6), 1348-1351.
- Gonzalez-Polo, M., Bahamonde, H. A., Peri, P. L., Mazzarino, M. J., Fariña, C., Caballe, G. (2019). Soil microbial processes in a pine silvopastoral system in NW Patagonia. *Agroforestry Systems*, 93(1), 255-266.
- Grayston, S.J., Griffith, G.S., Mawdsley, J.L., Campbell, C.D., Bardgett, R.D. (2001). Accounting for variability in soil microbial communities of temperate upland grassland ecosystems. *Soil Biology and Biochemistry*, 33(4-5), 533-551.
- Griffiths, B. S., Spilles, A., Bonkowski, M. (2012). C: N: P stoichiometry and nutrient limitation of the soil microbial biomass in a grazed grassland site under experimental P limitation or excess. *Ecological Processes*, 1(1), 6.
- Grigera, G., Oesterheld, M. (2004). Mycorrhizal colonization patterns under contrasting grazing and topographic conditions in the flooding pampa (Argentina). *Journal of Range Management*, 601-605.
- Grman, E. (2012). Plant species differ in their ability to reduce allocation to non-beneficial arbuscular mycorrhizal fungi. *Ecology*, 93(4), 711-718.
- Groffman, P. M., Egan, P., Sullivan, W. M., Lemunyon, J. L. (1996). Grass species and soil type effects on microbial biomass and activity. *Plant and soil*.183(1): 61-67.
- Guo, Z., Han, J., Li, J., Xu, Y., Wang, X. (2019). Effects of long-term fertilization on soil organic carbon mineralization and microbial community structure. *PloS one*, 14(1), e0211163.
- Hamilton, E.W., Frank, D.A. (2001). Can plants stimulate soil microbes and their own nutrient supply? Evidence from a grazing tolerant grass. *Ecology* 82: 2397–2402.
- Hamilton, E.W., Frank, D.A., Hinchey, P.M., Murray, T.R. (2008). Defoliation induces root exudation and triggers positive rhizospheric feedbacks in a temperate

- grassland. *Soil Biol. Biochem.* 40, 2865–2873.  
<https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2008.08.007>
- Harley, J. L., Smith, S. E. (1983). *Mycorrhizal Symbiosis*. Academic Press, Toronto.
- Harner, M. J., Opitz, N., Geluso, K., Tockner, K., Rillig, M. C. (2011). Arbuscular mycorrhizal fungi on developing islands within a dynamic river floodplain: an investigation across successional gradients and soil depth. *Aquatic Sciences*, 73(1), 35-42.
- Harris, R. F. (1981). Effect of water potential on microbial growth and activity. *Water potential relations in soil microbiology*, 9, 23-95.
- Harrison, K. A., Bardgett, R. D. (2004). Browsing by red deer negatively impacts on soil nitrogen availability in regenerating native forest. *Soil Biology and Biochemistry*, 36(1): 115-126.
- Harrison, M. J. (2005). Signaling in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Annu. Rev. Microbiol.*, 59, 19-42.
- Hart, R. H., Clapp, S., Test, P. S. (1993). Grazing strategies, stocking rates, and frequency and intensity of grazing on western wheatgrass and blue grama. *Rangeland Ecology & Management/Journal of Range Management Archives*, 46(2), 122-126.
- Hart, M. M., Reader, R. J. (2002). Host plant benefit from association with arbuscular mycorrhizal fungi: variation due to differences in size of mycelium. *Biology and Fertility of Soils*, 36(5), 357-366.
- Harte, J., Kinzig, A.P. (1993). Mutualism and competition between plants and decomposers: implications for nutrient allocation in ecosystems. *The American Naturalist*, 141(6), 829-846.
- Havstad, KM, Peters, DPC, Skaggs, R, Brown, J, Bestelmeyer, B, Fredrickson, E, Herrick, J, Wright, J (2007) Ecological services to and from rangelands of the United States. *Ecol Econ* 64(2):261–268
- Hawkes, C. V., Sullivan, J. J. (2001). The impact of herbivory on plants in different resource conditions: a meta-analysis. *Ecology*, 82(7): 2045-2058.
- Hawkes, C. V., Hartley, I. P., Ineson, P., Fitter, A. H. (2008). Soil temperature affects carbon allocation within arbuscular mycorrhizal networks and carbon transport from plant to fungus. *Global Change Biology*, 14(5), 1181-1190.
- Haynes, R. J. (2000). Labile organic matter as an indicator of organic matter quality in arable and pastoral soils in New Zealand. *Soil Biol. Biochem.* 32: 211-219.
- He, Z., Yao, H., Chen, G., Zhu, J., Huang, C. (1997). Relationship of crop yield to microbial biomass in highly-weathered soils of China. In *Plant Nutrition for Sustainable Food Production and Environment* (pp. 751-752). Springer, Dordrecht.
- Heinemeyer, A., Fitter, A. H. (2004). Impact of temperature on the arbuscular mycorrhizal (AM) symbiosis: growth responses of the host plant and its AM fungal partner. *Journal of Experimental Botany*, 55(396), 525-534.
- Heinemeyer, A., Ineson, P., Ostle, N., Fitter, A. H. (2006). Respiration of the external mycelium in the arbuscular mycorrhizal symbiosis shows strong dependence on recent photosynthates and acclimation to temperature. *New Phytologist*, 171(1), 159-170.
- Heisler-White, J. L., Knapp, A. K., Kelly, E. F. (2008). Increasing precipitation event size increases aboveground net primary productivity in a semi-arid grassland. *Oecologia*, 158(1), 129-140.

- Hertenberger, G., Zampach, P., Bachmann, G. (2002). Plant species affect the concentration of free sugars and free amino acids in different types of soil. *Journal of plant nutrition and soil science*, 165(5), 557-565.
- Hetrick, B.A.D., Wilson, G.W.T., Owensby, C.E., (1990). Mycorrhizal influences on big bluestem rhizome regrowth and clipping tolerance. *J. Range Manag.* 43, 286-290.
- Hijmans, R.J., Cameron, S.E., Parra, J.L., Jones, P.G., Jarvis, A. (2005). Very high resolution interpolated climate surfaces for global land areas. *International Journal of Climatology: A Journal of the Royal Meteorological Society*, 25(15), 1965-1978.
- Hodge, A., Storer, K. (2015). Arbuscular mycorrhiza and nitrogen: implications for individual plants through to ecosystems. *Plant Soil* 386, 1-19
- Hoeksema, J. D., Chaudhary, V. B., Gehring, C. A., Johnson, N. C., Karst, J., Koide, R. T., Wilson, G. W. (2010). A meta-analysis of context-dependency in plant response to inoculation with mycorrhizal fungi. *Ecology letters*, 13(3), 394-407.
- Hokka, V., Mikola, L., Vestberg, M., Setälä, H. (2004). Interactive effects of defoliation and an AM fungus on plants and soil organisms in experimental legume-grass communities. *Oikos* 106: 73-84.
- Holland, J. N., Cheng, W., Crossley, D. A. (1996). Herbivore-induced changes in plant carbon allocation: assessment of below-ground C fluxes using carbon-14. *Oecologia*, 107(1), 87-94.
- Holt, J.A. (1997). Grazing pressure and soil carbon, microbial biomass and enzyme activities in semi-arid northeastern Australia. *Applied Soil Ecology* 5: 143-149.
- Hortal, S., Bastida, F., Armas, C., Lozano, Y.M., Moreno, J.L., García, C., Pugnaire, F.I. (2013). Soil microbial community under a nurse-plant species changes in composition, biomass and activity as the nurse grows. *Soil Biology and Biochemistry*, 64, 139-146.
- Hortal, S., Bastida, F., Moreno, J. L., Armas, C., García, C., Pugnaire, F. I. (2015). Benefactor and allelopathic shrub species have different effects on the soil microbial community along an environmental severity gradient. *Soil Biology and Biochemistry*, 88, 48-57.
- Houghton, J. T., Ding, Y. D. J. G., Griggs, D. J., Noguer, M., Van Der Linden, P. J., Dai, X., Johnson, C. A. (2001). *Climate change 2001: the scientific basis*.
- Hu, J., Lin, X., Wang, J., Dai, J., Chen, R., Zhang, J., Wong, M. H. (2011). Microbial functional diversity, metabolic quotient, and invertase activity of a sandy loam soil as affected by long-term application of organic amendment and mineral fertilizer. *Journal of Soils and Sediments*. 11(2): 271-280.
- Insam, H., Parkinson, D., Domsch, K. H. (1989). Influence of macroclimate on soil microbial biomass. *Soil Biology and Biochemistry*, 21(2), 211-221.
- IPCC. (2007). (Intergovernmental Panel on Climate Change). Summary for policymakers. In: Solomon S, Qin D, Manning M, *et al.* *Climate Change 2007: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. Cambridge, United Kingdom, New York, NY, USA: Cambridge University Press.
- IPCC. (2013). Working Group I Contribution to the IPCC Fifth Assessment Report, *Climate Change 2013: The Physical Science Basis*. Cambridge University Press, New York, NY, USA.
- Jaeger, C.H., Monson, R.K., Fisk, M.C., Schmidt, S.K. (1999). Seasonal partitioning of nitrogen by plants and soil microorganisms in an alpine ecosystem. *Ecology*, 80(6), 1883-1891.

- Jakobsen, I., Rosendahl, L. (1990). Carbon flow into soil and external hyphae from roots of mycorrhizal cucumber plants. *New Phytologist*, 115(1), 77-83.
- Jenkinson D. S. (1988). Determination of microbial biomass carbon and nitrogen in soil. In: J.R. Wilson (Editor). *Advances in nitrogen cycling in agricultural systems*. CAB International,
- Jenny, H. (1980). The soil resource: origin and behavior. In: Billings, W.D., Lange, O.L., Remmert, K. (eds.), *Ecological Studies No. 37*. Springer, New York.
- Jensen, K. D., Beier, C., Michelsen, A., Emmett, B. A. (2003). Effects of experimental drought on microbial processes in two temperate heathlands at contrasting water conditions. *Applied Soil Ecology*. 24(2): 165-176.
- Jiang, Y., Wang, W., Xie, Q., Liu, N., Liu, L., Wang, D., Wang, E. (2017). Plants transfer lipids to sustain colonization by mutualistic mycorrhizal and parasitic fungi. *Science*, 356(6343), 1172-1175.
- Jobbágy, E., Paruelo, J. M., León, R. J. C. (1995). Estimación del régimen de precipitación a partir de la distancia a la cordillera en el noroeste de la Patagonia. *Ecología Austral*. 5:47-53.
- Jobbágy, E. G., Sala, O. E. (2000). Controls of grass and shrub aboveground production in the Patagonian steppe. *Ecological Applications*, 10(2), 541-549.
- Jobbágy, E., Sala, O.E., Paruelo, J.M., (2002). Patterns and controls of primary production in the Patagonian steppe: a remote sensing approach. *Ecology*, 83(2), 307-319.
- Joergensen, R. G., Anderson, T. H., Wolters, V. (1995). Carbon and nitrogen relationships in the microbial biomass of soils in beech (*Fagus sylvatica* L.) forests. *Biology and Fertility of Soils*. 19(2-3): 141-147.
- Joergensen, R.G. (1996). The fumigation-extraction method to estimate soil microbial biomass: calibration of the kEC value. *Soil Biology and Biochemistry*, 28(1), 25-31.
- Johnson, L. C., Matchett, J. R. (2001). Fire and grazing regulate belowground processes in tallgrass prairie. *Ecology*, 82(12), 3377-3389.
- Johnson, D., Booth, R. E., Whiteley, A. S., Bailey, M. J., Read, D. J., Grime, J. P., Leake, J. R. (2003). Plant community composition affects the biomass, activity and diversity of microorganisms in limestone grassland soil. *European Journal of Soil Science*, 54(4), 671-678.
- Johnson, D., Vandenkoornhuys, P. J., Leake, J. R., Gilbert, L., Booth, R. E., Grime, J. P., Read, D. J. (2004). Plant communities affect arbuscular mycorrhizal fungal diversity and community composition in grassland microcosms. *New phytologist*, 161(2), 503-515.
- Jonasson, S., Michelsen, A., Schmidt, I.K. (1999). Coupling of nutrient cycling and carbon dynamics in the Arctic, integration of soil microbial and plant processes. *Appl. Soil Ecol.* 11, 135–146.
- Kaiser, M., Kleber, M., Berhe, A. A. (2015). How air-drying and rewetting modify soil organic matter characteristics: an assessment to improve data interpretation and inference. *Soil Biology and Biochemistry*, 80, 324-340.
- Kandeler, E., Böhm, K. E. (1996). Temporal dynamics of microbial biomass, xylanase activity, N-mineralisation and potential nitrification in different tillage systems. *Applied Soil Ecology*. 4(3): 181-191.
- Kaur, K., Kapoor, K. K., Gupta, A. P. (2005). Impact of organic manures with and without mineral fertilizers on soil chemical and biological properties under tropical conditions. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 168(1), 117-122.

- Keiblinger, K. M., Hall, E. K., Wanek, W., Szukics, U., Hämmerle, I., Ellersdorfer, G., Zechmeister-Boltenstern, S. (2010). The effect of resource quantity and resource stoichiometry on microbial carbon-use-efficiency. *FEMS Microbiology Ecology*, 73(3), 430-440.
- Kennedy, N., Edwards, S., Clipson, N. (2005). Soil bacterial and fungal community structure across a range of unimproved and semi-improved upland grasslands. *Microbial ecology*, 50(3), 463-473.
- Kent, A. D., Triplett, E. W. (2002). Microbial communities and their interactions in soil and rhizosphere ecosystems. *Annual Reviews in Microbiology*, 56(1), 211-236.
- Kheirfam, H. (2020). Increasing soil potential for carbon sequestration using microbes from biological soil crusts. *Journal of Arid Environments*, 172, 104022.
- Kieft, T.L. (1994). Grazing and plant-canopy effects on semiarid soil microbial biomass and respiration. *Biology and Fertility of Soils*, 18(2), 155-162.
- Kiers, E. T., Duhamel, M., Beesetty, Y., Mensah, J. A., Franken, O., Verbruggen, E., Palmer, T. M. (2011). Reciprocal rewards stabilize cooperation in the mycorrhizal symbiosis. *science*, 333(6044), 880-882.
- Killham, K., Firestone, M. K. (1984). Salt stress control of intracellular solutes in streptomycetes indigenous to saline soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 47(2), 301-306.
- Killham, K. (1994). *Soil ecology*. Cambridge University Press.
- Klironomos, J. N., McCune, J., Moutoglou, P. (2004). Species of arbuscular mycorrhizal fungi affect mycorrhizal responses to simulated herbivory. *Applied Soil Ecology*, 26(2), 133-141.
- Koch, A. M., Croll, D., Sanders, I. R. (2006). Genetic variability in a population of arbuscular mycorrhizal fungi causes variation in plant growth. *Ecology letters*, 9(2), 103-110.
- Kosola, K. R., Durall, D. M., Robertson, G. P., Dickmann, D. I., Parry, D., Russell, C. A., Paul, E. A. (2004). Resilience of mycorrhizal fungi on defoliated and fertilized hybrid poplars. *Canadian Journal of Botany*. 82(5): 671-680.
- Kothmann, M. M. (1984). "Concepts and Principles Underlying Grazing Systems": a discussant paper.
- Kreps, G., Martínez Pastur, G., Peri, P. L. (2012). Cambio climático en Patagonia Sur: Escenarios futuros en el manejo de los recursos naturales. Ediciones INTA, Buenos Aires.
- Krüger, I., Chartin, C., van Wesemael, B., Carnol, M. (2018). Defining a reference system for biological indicators of agricultural soil quality in Wallonia, Belgium. *Ecological Indicators*, 95, 568-578.
- Kula, A. A., Hartnett, D. C., Wilson, G. W. (2005). Effects of mycorrhizal symbiosis on tallgrass prairie plant-herbivore interactions. *Ecology Letters*, 8(1), 61-69.
- Kytöviita, M. M., Ruotsalainen, A. L. (2007). Mycorrhizal benefit in two low arctic herbs increases with increasing temperature. *American Journal of Botany*, 94(8), 1309-1315.
- Lal, R. (2004). Soil carbon sequestration impacts on global climate change and food security. *science*, 304(5677), 1623-1627.
- Landgraf, D., Klose, S. (2002). Mobile and readily available C and N fractions and their relationship to microbial biomass and selected enzyme activities in a sandy soil under different management systems. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 165: 9-16.
- Lange, M., Eisenhauer, N., Sierra, C. A., Bessler, H., Engels, C., Griffiths, R. I., Steinbeiss, S. (2015). Plant diversity increases soil microbial activity and soil carbon storage. *Nature communications*, 6(1), 1-8.

- Laskowski, R., Niklinska, M., Maryanski, M. (1995). The dynamics of chemical elements in forest litter. *Ecology* 76: 1393-1406.
- Lauber, C.L., Strickland, M.S., Bradford, M.A., Fierer, N. (2008). The influence of soil properties on the structure of bacterial and fungal communities across land-use types. *Soil Biology and Biochemistry*, 40(9), 2407-2415.
- Lauenroth, W. K., Sala, O. E. (1992). Long-term forage production of North American shortgrass steppe. *Ecological applications*, 2(4), 397-403.
- Lee, K. H., Jose, S. (2003). Soil respiration, fine root production, and microbial biomass in cottonwood and loblolly pine plantations along a nitrogen fertilization gradient. *Forest Ecology and Management*, 185(3), 263-273.
- Leff, J.W., Jones, S.E., Prober, S.M., Barberán, A., Borer, E.T., Firn, J.L., McCulley, R.L. (2015). Consistent responses of soil microbial communities to elevated nutrient inputs in grasslands across the globe. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(35), 10967-10972.
- Lehto, T., Zwiazek, J. J. (2011). Ectomycorrhizas and water relations of trees: a review. *Mycorrhiza*, 21(2), 71-90.
- Lei, T., Pang, Z., Wang, X., Li, L., Fu, J., Kan, G., Shao, C. (2016). Drought and carbon cycling of grassland ecosystems under global change: A review. *Water*, 8(10), 460.
- Lekberg, Y. L. V. A., Koide, R. T., Rohr, J. R., Aldrich-Wolfe, L., Morton, J. B. (2007). Role of niche restrictions and dispersal in the composition of arbuscular mycorrhizal fungal communities. *Journal of Ecology*, 95(1), 95-105.
- Lekberg, Y., Meadow, J., Rohr, J. R., Redecker, D., Zabinski, C. A. (2011). Importance of dispersal and thermal environment for mycorrhizal communities: lessons from Yellowstone National Park. *Ecology*, 92(6), 1292-1302.
- Levy, E.B., Madden, E.A. (1933). The point method of pasture analysis. *New Zealand Journal of Agriculture* 46(5): 267-179.
- Lezama, F., Paruelo, J. M. (2016). Disentangling grazing effects: trampling, defoliation and urine deposition. *Applied vegetation science*, 19(4), 557-566.
- Li, Y., Dong, S., Wen, L., Wang, X., Wu, Y. (2013). The effects of fencing on carbon stocks in the degraded alpine grasslands of the Qinghai-Tibetan Plateau. *Journal of environmental management*, 128, 393-399.
- Li, X., Zhu, T., Peng, F., Chen, Q., Lin, S., Christie, P., Zhang, J. (2015). Inner Mongolian steppe arbuscular mycorrhizal fungal communities respond more strongly to water availability than to nitrogen fertilization. *Environmental microbiology*, 17(8), 3051-3068.
- Liang, C., Amelung, W., Lehmann, J., Kästner, M. (2019). Quantitative assessment of microbial necromass contribution to soil organic matter. *Global change biology*.
- Liao, J.D., Boutton, T.W. (2008). Soil microbial biomass response to woody plant invasion of grassland. *Soil Biology and Biochemistry*, 40(5), 1207-1216.
- Liasu, M. O., Shosanya, O. (2007). Studies of microbial development on mycorrhizosphere and rhizosphere soils of potted maize plants and the inhibitory effect of rhizobacteria isolates on two fungi. *African Journal of Biotechnology*. 6(5).
- Liebisch, F., Keller, F., Huguenin-Elie, O., Frossard, E., Oberson, A., Bünemann, E.K. (2014). Seasonal dynamics and turnover of microbial phosphorus in a permanent grassland. *Biology and fertility of soils*, 50(3), 465-475.
- Lin, Y., Hong, M., Han, G., Zhao, M., Bai, Y., Chang, S. X. (2010). Grazing intensity affected spatial patterns of vegetation and soil fertility in a desert steppe. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 138(3-4), 282-292.

- Lin, B., Zhao, X., Zheng, Y., Qi, S., Liu, X. (2017). Effect of grazing intensity on protozoan community, microbial biomass, and enzyme activity in an alpine meadow on the Tibetan Plateau. *Journal of soils and sediments*, 17(12), 2752-2762.
- Lipson, D. A., Schmidt, S. K., Monson, R. K. (2000). Carbon availability and temperature control the post-snowmelt decline in alpine soil microbial biomass. *Soil Biology and Biochemistry*, 32(4), 441-448.
- Lipson, D. A., Monson, R. K., Schmidt, S. K., Weintraub, M. N. (2009). The trade-off between growth rate and yield in microbial communities and the consequences for under-snow soil respiration in a high elevation coniferous forest. *Biogeochemistry*, 95(1), 23-35.
- Liu, A., Wang, B., Hamel, C. (2004). Arbuscular mycorrhiza colonization and development at suboptimal root zone temperature. *Mycorrhiza*, 14(2), 93-101.
- Liu, Z., Liu, G., Fu, B., Zheng, X. (2008). Relationship between plant species diversity and soil microbial functional diversity along a longitudinal gradient in temperate grasslands of Hulunbeir, Inner Mongolia, China. *Ecological Research*, 23(3), 511-518.
- Liu, W., Zhang, Z. H. E., Wan, S. (2009). Predominant role of water in regulating soil and microbial respiration and their responses to climate change in a semiarid grassland. *Global Change Biology*, 15(1), 184-195.
- Liu, Z., Fu, B., Zheng, X., Liu, G. (2010). Plant biomass, soil water content and soil N: P ratio regulating soil microbial functional diversity in a temperate steppe: a regional scale study. *Soil Biology and Biochemistry*, 42(3), 445-450.
- Liu, N., Zhang, Y., Chang, S., Kan, H., Lin, L. (2012). Impact of grazing on soil carbon and microbial biomass in typical steppe and desert steppe of Inner Mongolia. *PLoS one*, 7(5).
- Liu, N., Kan, H.M., Yang, G.W., Zhang, Y.J., (2015). Changes in plant, soil, and microbes in a typical steppe from simulated grazing: explaining potential change in soil C. *Ecological Monographs*, 85(2), 269-286.
- Liu, H., Mi, Z., Lin, L., Wang, Y., Zhang, Z., Zhang, F. Zhao, X. (2018). Shifting plant species composition in response to climate change stabilizes grassland primary production. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(16), 4051-4056.
- Lugo, M.A., Cabello, M.N. (2003). Arbuscular mycorrhizal fungi in a mountain grassland. II. Seasonal variation of colonization studied, along with its relation to grazing and metabolic host type. *Mycologia* 95, 407e415
- Maestre, F.T., Delgado-Baquerizo, M., Jeffries, T.C., Eldridge, D.J., Ochoa, V., Gozalo, B., Bowker, M.A. (2015). Increasing aridity reduces soil microbial diversity and abundance in global drylands. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(51), 15684-15689.
- Manero, A., Clifton, G., Barria, D. (2006). Determinación de la dieta de ovinos para la parametrización del módulo animal del Modelo Savanna. En: Peri P L (Ed) Desarrollo de un sistema de soporte de decisiones para mejorar porcentajes de señalada de modo ecológicamente sustentable en establecimientos de la estepa magallánica (Patagonia). INTA-Centro Regional Patagonia Sur, EEA-Santa Cruz. pp. 71-76.
- Marcos, M. S., Olivera, N. L. (2016). Microbiological and Biochemical Indicators for Assessing Soil Quality in Drylands from Patagonia. In *Biology and Biotechnology of Patagonian Microorganisms* (pp. 91-108). Springer, Cham.

- Marschner, P., Kandeler, E., Marschner, B. (2003). Structure and function of the soil microbial community in a long-term fertilizer experiment. *Soil Biology and Biochemistry*, 35(3), 453-461.
- Martínez, L. B., Pugnaire, F. I. (2009). Interacciones entre las comunidades de hongos formadores de micorrizas arbusculares y de plantas. Algunos ejemplos en los ecosistemas semiáridos. *Revista Ecosistemas*, 18(2).
- Martínez-García, L. B., Ochoa-Hueso, R., Manrique, E., Pugnaire, F. I. (2015). Different mycorrhizal fungal strains determine plant community response to nitrogen and water availability. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 178(1), 146-154.
- Mazzonia, E., Vazquez, M. (2009). Desertification in Patagonia. *Developments in Earth Surface Processes*, 13, 351-377.
- McCaig, A.E., Glover, L.A., Prosser, J.I. (1999). Molecular analysis of bacterial community structure and diversity in unimproved and improved upland grass pastures. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65(4), 1721-1730.
- McGonigle, T. P., Miller, M. H., Evans, D. G., Fairchild, G. L., Swan, J. A. (1990). A new method which gives an objective measure of colonization of roots by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol.* 115: 495 -501.
- McSherry, M. E., Ritchie, M. E. (2013). Effects of grazing on grassland soil carbon: a global review. *Global change biology*, 19(5), 1347-1357.
- Medina-Roldan, E., Arredondo, J. T., Huber-Sannwald, E., Chapa-Vargas, L., Olalde-Portugall, V. (2008). Grazing effects on fungal root symbionts and carbon and nitrogen storage in a shortgrass steppe in Central Mexico. *Journal of Arid Environments* 72: 546-556.
- Mendoza, R. E., Goldmann, V., Rivas, J., Escudero, V., Pagani, E., Collantes, M., Marbán, L. (2002). Poblaciones de hongos micorrízicos arbusculares en relación con las propiedades del suelo y de la planta hospedante en pastizales de Tierra del Fuego. *Ecología austral*, 12(2), 105-116.
- Menyailo, O.V., Hungate, B.A., Zech, W. (2002). The effect of single tree species on soil microbial activities related to C and N cycling in the Siberian artificial afforestation experiment. *Plant and Soil*, 242(2), 183-196.
- Merrick, M. J., Edwards, R. A. (1995). Nitrogen control in bacteria. *Microbiological reviews*. 59(4): 604-622.
- Michelsen, A., Graglia, E., Schmidt, I. K., Jonasson, S., Sleep, D., Quarmby, C. (1999). Differential responses of grass and a dwarf shrub to long-term changes in soil microbial biomass C, N and P following factorial addition of NPK fertilizer, fungicide and labile carbon to a heath. *New Phytologist*. 143 (3): 523-538.
- Micks, P., Aber, J. D., Boone, R. D., Davidson, E. A. (2004). Short-term soil respiration and nitrogen immobilization response to nitrogen applications in control and nitrogen-enriched temperate forests. *Forest Ecology and Management*, 196(1), 57-70.
- Mikola, J., Yeates, G. W., Barker, G. M., Wardle, D. A., Bonner, K. I. (2001). Effects of defoliation intensity on soil food-web properties in an experimental grassland community. *Oikos*. 92(2): 333-343.
- Mikola, J., Setälä, H., Virkajärvi, P., Saarijärvi, K., Ilmarinen, K., Voigt, W., Vestberg, M. (2009). Defoliation and patchy nutrient return drive grazing effects on plant and soil properties in a dairy cow pasture. *Ecological Monographs*, 79(2), 221-244.
- Miller, R. M., Smith, C. I., Jastrow, J. D., Bever, J. D. (1999). Mycorrhizal status of the genus *Carex* (Cyperaceae). *American Journal of Botany*, 86(4), 547-553.



- Miller, R. M., Wilson, G. W. T., Johnson, N. C. (2012). Arbuscular Mycorrhizae and Grassland Ecosystems. In D. Southworth (Ed.), *Biocomplexity of plant–fungal interactions* (pp. 59– 84). London, UK: Wiley-Blackwell.
- Mohammad, M. J., Hamad, S. R., Malkawi, H. I. (2003). Population of arbuscular mycorrhizal fungi in semi-arid environment of Jordan as influenced by biotic and abiotic factors. *Journal of arid environments*, 53(3), 409-417.
- Moinet, G. Y., Cieraad, E., Hunt, J. E., Fraser, A., Turnbull, M. H., Whitehead, D. (2016). Soil heterotrophic respiration is insensitive to changes in soil water content but related to microbial access to organic matter. *Geoderma*, 274, 68-78.
- Mott, J. J., Williams, J., Andrew, M. H., Gillison, A. N. (1985). Australian savanna ecosystems. *Ecology and management of the world's savannas*. 56-82.
- Muldavin, E. H., Moore, D. I., Collins, S. L., Wetherill, K. R., Lightfoot, D. C. (2008). Aboveground net primary production dynamics in a northern Chihuahuan Desert ecosystem. *Oecologia*, 155(1), 123-132.
- Mundra, S., Bahram, M., Tedersoo, L., Kauserud, H., Halvorsen, R., Eidesen, P. B. (2015). Temporal variation of *Bistorta vivipara*-associated ectomycorrhizal fungal communities in the High Arctic. *Molecular ecology*, 24(24), 6289-6302.
- Mundra, S., Halvorsen, R., Kauserud, H., Bahram, M., Tedersoo, L., Elberling, B., Eidesen, P. B. (2016). Ectomycorrhizal and saprotrophic fungi respond differently to long-term experimentally increased snow depth in the High Arctic. *MicrobiologyOpen*, 5(5), 856-869.
- Mureva, A., Ward, D. (2017). Soil microbial biomass and functional diversity in shrub-encroached grasslands along a precipitation gradient. *Pedobiologia*, 63, 37-45.
- Nannipieri, P., Ascher, J., Ceccherini, M., Landi, L., Pietramellara, G., Renella, G. (2003). Microbial diversity and soil functions. *European journal of soil science*, 54(4), 655-670.
- Nie, M., Bell, C., Wallenstein, M. D., Pendall, E. (2015). Increased plant productivity and decreased microbial respiratory C loss by plant growth-promoting rhizobacteria under elevated CO<sub>2</sub>. *Scientific reports*, 5, 9212.
- Nielsen, M. N., Winding, A., Binnerup, S., Hansen, B. M., Hendriksen, N. B., Kroer, N. (2002). Microorganisms as indicators of soil health. National Environmental Research Institute. NERI Technical report. (388).
- Noellemeyer, E., Frank, F., Alvarez, C., Morazzo, G., Quiroga, A. (2008). Carbon contents and aggregation related to soil physical and biological properties under a land-use sequence in the semiarid region of central Argentina. *Soil and Tillage Research*, 99(2), 179-190.
- Northup, B.K., Brown, J.R., Holt, J.A. (1999). Grazing impacts on the spatial distribution of soil microbial biomass around tussock grasses in a tropical grassland. *Applied Soil Ecology* 13: 259-270.
- Nosetto, M. D., Jobbágy, E. G., Paruelo, J. M. (2006). Carbon sequestration in semi-arid rangelands: comparison of *Pinus ponderosa* plantations and grazing exclusion in NW Patagonia. *Journal of Arid Environments*, 67(1), 142-156.
- Nouri, E., Breuillin-Sessoms, F., Feller, U., Reinhardt, D. (2014). Phosphorus and nitrogen regulate arbuscular mycorrhizal symbiosis in *petunia hybrida*. *PLoS ONE*, 9, 1– 14.
- Ochoa-Hueso, R., Collins, S.L., Delgado-Baquerizo, M., Hamonts, K., Pockman, W.T., Sinsabaugh, R.L., Power, S.A. (2018). Drought consistently alters the composition of soil fungal and bacterial communities in grasslands from two continents. *Global change biology*, 24(7), 2818-2827.

- Ochoa-Hueso, R., Eldridge, D. J., Delgado-Baquerizo, M., Soliveres, S., Bowker, M. A., Gross, N., Arredondo, T. (2018). Soil fungal abundance and plant functional traits drive fertile island formation in global drylands. *Journal of Ecology*, 106(1), 242-253.
- Oehl, F., Sieverding, E., Ineichen, K., Mäder, P., Boller, T., & Wiemken, A. (2003). Impact of land use intensity on the species diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in agroecosystems of Central Europe. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69(5), 2816-2824.
- Omay, A. B., Rice, C. W., Maddux, L. D., Gordon, W. B. (1997). Changes in soil microbial and chemical properties under long-term crop rotation and fertilization. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 61:1672-1678.
- Onwosi, C. O., Odimba, J. N., Igbokwe, V. C., Nduka, F. O., Nwagu, T. N., Aneke, C. J., Eke, I. E. (2019). Principal component analysis reveals microbial biomass carbon as an effective bioindicator of health status of petroleum-polluted agricultural soil. *Environmental Technology*, 1-13.
- Ormaechea, S. G., Peri, P. L. (2015). Landscape heterogeneity influences on sheep habits under extensive grazing management in Southern Patagonia.
- Ormaechea, S. G., Peri, P. L., Cipriotti, P. A., Distel, R. A. (2019). El cuadro de pastoreo en los sistemas extensivos de Patagonia Sur. *Percepción y manejo de la heterogeneidad. Ecología Austral*, 29(2), 174-184.
- Pagano, M. C., Lugo, M. A. (Eds.). (2019). *Mycorrhizal Fungi in South America*. Springer International Publishing.
- Parniske, M. (2004). Molecular genetics of the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Current opinion in plant biology*, 7(4), 414-421.
- Patra, A.K., Abbadie, L., Clays-Josserand, A., Degrange, V., Grayston, S.J., Loiseau, P., Poly, F., (2005). Effects of grazing on microbial functional groups involved in soil N dynamics. *Ecological Monographs*, 75(1), 65-80.
- Paul, E. A., Clark, F. E. (1989). *Soil microbiology and biochemistry*. Academic, San Diego.
- Paul, E. A., Clark, F. E. (1996). *Soil microbiology and biochemistry*. Academic Press, Inc. San Diego, CA, USA.
- Peacock, A. G., Mullen, M. D., Ringelberg, D. B., Tyler, D. D., Hedrick, D. B., Gale, P. M., White, D. C. (2001). Soil microbial community responses to dairy manure or ammonium nitrate applications. *Soil Biology and Biochemistry*, 33(7-8), 1011-1019.
- Pei, S., Fu, H., Wan, C. (2008). Changes in soil properties and vegetation following exclosure and grazing in degraded Alxa desert steppe of Inner Mongolia, China. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 124(1-2), 33-39.
- Peng, Q., Dong, Y., Qi, Y., Xiao, S., He, Y., Ma, T. (2011). Effects of nitrogen fertilization on soil respiration in temperate grassland in Inner Mongolia, China. *Environmental Earth Sciences*, 62(6), 1163-1171.
- Peri, P. L., Moot, D. J., Mcneil, D. L., Lucas, R. J. (2003). Modelling net photosynthetic rate of field-grown cocksfoot leaves to account for regrowth duration. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 46(2), 105-115.
- Peri, P.L., (2011). Carbon Storage in Cold Temperate Ecosystems in Southern Patagonia, Argentina. In: Islam Atazadeh (ed.), *Biomass and Remote Sensing of Biomass*. pp. 213-226. InTech, Lijeka, Croatia.
- Peri, P. L., Lencinas, M. V., Martinez Pastur G., Wardell-Johnson G. W., Lasagno R. (2013). Diversity patterns in the steppe of Argentinean Southern Patagonia: Environmental drivers and impact of grazing. En: *Steppe Ecosystems: Biological*

- Diversity, Management and Restoration (Eds. Morales Prieto M.B. and Traba Díaz J.), pp.73-95 (Chapter 4). NOVA Science Publishers, Inc., New York, USA. 346 pp. ISBN: 978-1-62808-298-2.
- Peri, P.L., Bahamonde, H., Christiansen, R., (2015). Soil respiration in Patagonian semiarid grasslands under contrasting environmental and use conditions. *Journal of Arid Environments*. 119: 1-8.
- Peri, P.L., Ladd, B., Lasagno, R.G., Pastur, G.M., (2016). The effects of land management (grazing intensity) vs. the effects of topography, soil properties, vegetation type, and climate on soil carbon concentration in Southern Patagonia. *Journal of Arid Environments*. 134: 73-78.
- Peri, P. L., Lencinas, M. V., Bousson, J., Lasagno, R., Soler, R., Bahamonde, H., Pastur, G. M. (2016). Biodiversity and ecological long-term plots in Southern Patagonia to support sustainable land management: The case of PEBANPA network. *Journal for nature conservation*, 34, 51-64.
- Peri, P. L., Rosas, Y. M., Ladd, B., Toledo, S., Lasagno, R. G., Martínez Pastur, G. (2018). Modelling soil carbon content in South Patagonia and evaluating changes according to climate, vegetation, desertification and grazing. *Sustainability*, 10(2), 438. <https://doi.org/10.3390/su10020438>
- Peri, P. L., Rosas, Y. M., Ladd, B., Toledo, S., Lasagno, R. G., Martínez Pastur, G. (2019). Modeling soil nitrogen content in South Patagonia across a climate gradient, vegetation type, and grazing. *Sustainability*, 11(9), 2707.
- Phillips, J. M., Hayman, D. S. (1970). Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society*. 55: 157-160.
- Piao, H. C., Hong, Y. T., Yuan, Z. Y. (2000). Seasonal changes of microbial biomass carbon related to climatic factors in soils from karst areas of southwest China. *Biology and Fertility of Soils*, 30(4), 294-297.
- Pietikäinen, A., Kytöviita, M. M., & Vuoti, U. (2005). Mycorrhiza and seedling establishment in a subarctic meadow: effects of fertilization and defoliation. *Journal of Vegetation Science*, 16(2), 175-182.
- Piippo, S., Huhta, A. P., Rautio, P., Markkola, A., Tuomi, J. (2011). Grazing tolerance and mycorrhizal colonization: Effects of resource manipulation and plant size in biennial *Gentianella campestris*. *Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, 206(9), 808-813.
- Piippo, S., Markkola, A., Härmä, E., Tuomi, J. (2011). Do compensatory shoot growth and mycorrhizal symbionts act as competing above-and below-ground sinks after simulated grazing?. *Plant ecology*, 212(1), 33-42.
- Piñeiro, G., Paruelo, J. M., Oesterheld, M., Jobbágy, E. G. (2010). Pathways of grazing effects on soil organic carbon and nitrogen. *Rangeland Ecology & Management*, 63(1), 109-119.
- Ponge, J.F. (2015). The soil as an ecosystem. *Biology and fertility of soils*, 51(6), 645-648.
- Porensky, L. M., Derner, J. D., Augustine, D. J., Milchunas, D. G. (2017). Plant community composition after 75 yr of sustained grazing intensity treatments in shortgrass steppe. *Rangeland Ecology & Management*, 70(4), 456-464.
- Powlson, D. S. (1994). The soil microbial biomass: before, beyond and back.
- Prévost-Bouré, N.C., Christen, R., Dequiedt, S., Mougel, C., Lelievre, M., Jolivet, C., Shahbazkia, H.R., Guillou, L., Arrouays, D., Ranjard, L. (2011). Validation and

- application of a PCR primer set to quantify fungal communities in the soil environment by real-time quantitative PCR. *PloS one*, 6(9), e24166.
- Prieto, L.H., Bertiller, M.B., Carrera, A.L., Olivera, N.L. (2011). Soil enzyme and microbial activities in a grazing ecosystem of Patagonian Monte, Argentina. *Geoderma*, 162(3-4), 281-287.
- Raich, J.W., Schlesinger, W.H. (1992). The global carbon dioxide flux in soil respiration and its relationship to vegetation and climate. *Tellus B*, 44(2), 81-99.
- Raiesi, F., Asadi, E. (2006). Soil microbial activity and litter turnover in native grazed and ungrazed rangelands in a semiarid ecosystem. *Biology and Fertility of Soils*, 43(1), 76-82.
- Reeder, J.D., Schuman, G.E. (2002). Influence of livestock grazing on C sequestration in semi-arid mixed-grass and short-grass rangelands. *Environmental pollution*, 116(3), 457-463.
- Ren, C., Zhao, F., Shi, Z., Chen, J., Han, X., Yang, G., Ren, G. (2017). Differential responses of soil microbial biomass and carbon-degrading enzyme activities to altered precipitation. *Soil Biology and Biochemistry*, 115, 1-10.
- Ren, C., Zhang, W., Zhong, Z., Han, X., Yang, G., Feng, Y., Ren, G. (2018). Differential responses of soil microbial biomass, diversity, and compositions to altitudinal gradients depend on plant and soil characteristics. *Science of the Total Environment*, 610, 750-758.
- Ren, H., Gui, W., Bai, Y., Stein, C., Rodrigues, J.L.M., Wilson, G.W.T., Cobb, A.B., Zhang, Y., Yang, G., (2018). Long-term effects of grazing and topography on extra-radical hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi in semi-arid grasslands. *Mycorrhiza* 28(2), 117–127.
- Reyer, C. P., Leuzinger, S., Rammig, A., Wolf, A., Bartholomeus, R. P., Bonfante, A., Klein, T. (2013). A plant's perspective of extremes: terrestrial plant responses to changing climatic variability. *Global change biology*, 19(1), 75-89.
- Reyes, M.F., Aguiar, M.R. (2017). Is the zone of influence colonized by roots of neighboring species? Field tests in a Patagonian steppe. *J. Arid Environ.* 137, 30e34
- Richter, A., Huallacháin, D.Ó., Doyle, E., Clipson, N., Van Leeuwen, J.P., Heuvelink, G.B., Creamer, R.E., (2018). Linking diagnostic features to soil microbial biomass and respiration in agricultural grassland soil: a large-scale study in Ireland. *European journal of soil science*, 69(3), 414-428.
- Riggs, C. E., Hobbie, S. E. (2016). Mechanisms driving the soil organic matter decomposition response to nitrogen enrichment in grassland soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 99, 54-65.
- Rillig, M. C., Wright, S. F., Shaw, M. R., Field, C. B. (2002). Artificial climate warming positively affects arbuscular mycorrhizae but decreases soil aggregate water stability in an annual grassland. *Oikos*, 97(1), 52-58.
- Rillig, M. C. (2004). Arbuscular mycorrhizae and terrestrial ecosystem processes. *Ecology letters*, 7(8), 740-754.
- Ritchie, M.E., Tilman, D., Knops, J.M. (1998). Herbivore effects on plant and nitrogen dynamics in oak savanna. *Ecology*. 79(1), 165-177.
- Robertson, G.P., Wedin, D., Groffmann, P.M., Blair, J.M., Holland, E.A., Nadelhoffer, K.J., Harris, D. (1999). Soil carbon and nitrogen availability: nitrogen mineralization, nitrification, and soil respiration potentials. In *Standard soil methods for long-term ecological research* (pp. 258-271).

- Rodríguez-Echeverría, S., Armas, C., Pistón, N., Hortal, S., Pugnaire, F.I. (2013). A role for below-ground biota in plant–plant facilitation. *Journal of Ecology*, 101(6), 1420-1428.
- Romaniuk, R., Costantini, A., Giuffré, L., Nannipieri, P. (2016). Catabolic response and phospholipid fatty acid profiles as microbial tools to assess soil functioning. *Soil Use and Management*, 32(4), 603-612.
- Roper, M. M., Gupta, V. (1995). Management practices and soil biota. *Aust. J. Soil Res.* 33: 321-339.
- Rosacker, L. L., Kieft, T. L. (1990). Biomass and adenylate energy charge of a grassland soil during drying. *Soil Biology and Biochemistry*. 22(8): 1121-1127.
- Ross, D. J., Orchard, V. A., Rhoades, D. A. (1984). Temporal fluctuations in biochemical properties of soil under pasture. I. Respiratory activity and microbial biomass. *Soil Research*. 22(3): 303-317.
- Rousk, J., Bååth, E., Brookes, P. C., Lauber, C. L., Lozupone, C., Caporaso, J. G., Fierer, N. (2010). Soil bacterial and fungal communities across a pH gradient in an arable soil. *The ISME journal*, 4(10), 1340-1351.
- Ruotsalainen, A. L., Eskelinen, A. (2011). Root fungal symbionts interact with mammalian herbivory, soil nutrient availability and specific habitat conditions. *Oecologia*, 166(3), 807-817.
- Saetre, P., Stark, J. M. (2005). Microbial dynamics and carbon and nitrogen cycling following re-wetting of soils beneath two semi-arid plant species. *Oecologia*. 142(2): 247-260.
- Saikkonen, K., Ahonen-Jonnarth, U., Markkola, A. M., Helander, M., Tuomi, J., Roitto, M., Ranta, H. (1999). Defoliation and mycorrhizal symbiosis: a functional balance between carbon sources and below-ground sinks. *Ecology Letters*, 2(1), 19-26.
- Saito, K., Suyama, Y., Sato, S., Sugawara, K. (2004). Defoliation effects on the community structure of arbuscular mycorrhizal fungi based on 18S rDNA sequences. *Mycorrhiza*, 14(6), 363-373.
- Sala, O.E. (1988). The effect of herbivory on vegetation structure. *Plant form and vegetation structure*, 317-330.
- Sala, O. E., Lauenroth, W. K., Parton, W. J. (1992). Long-term soil water dynamics in the shortgrass steppe. *Ecology*, 73(4), 1175-1181.
- Sala, O. E., Paruelo, J. M. (1997). Ecosystem services in grasslands. *Nature's services: Societal dependence on natural ecosystems*, 237-251.
- Sánchez-Castro, I., Ferrol, N., Barea, J. M. (2012). Analyzing the community composition of arbuscular mycorrhizal fungi colonizing the roots of representative shrubland species in a Mediterranean ecosystem. *Journal of arid environments*, 80, 1-9.
- Sankaran, M., Augustine, D. J. (2004). Large herbivores suppress decomposer abundance in a semiarid grazing ecosystem. *Ecology*. 85(4): 1052-1061.
- Saviozzi, A., Levi-Minzi, R., Cardelli, R., Riffaldi, R. (2001). A comparison of soil quality in adjacent cultivated forest and native grassland soils. *Plant Soil* 223: 251-259.
- Savory, A., Butterfield, J. (2016). *Holistic management: a commonsense revolution to restore our environment*. Island Press.
- Schimel, J. P., Gullledge, J. M., Clein-Curley, J. S., Lindstrom, J. E., Braddock, J. F. (1999). Moisture effects on microbial activity and community structure in decomposing birch litter in the Alaskan taiga. *Soil Biology and Biochemistry*, 31(6), 831-838.
- Schimel, J., Balser, T. C., Wallenstein, M. (2007). Microbial stress-response physiology and its implications for ecosystem function. *Ecology*, 88(6), 1386-1394.

- Schlesinger, W. H., Raikes, J. A., Hartley, A. E., Cross, A. F. (1996). On the spatial pattern of soil nutrients in desert ecosystems: ecological archives E077-002. *Ecology*, 77(2), 364-374.
- Schlöter, M., Nannipieri, P., Sørensen, S.J., van Elsas, J.D. (2018). Microbial indicators for soil quality. *Biology and Fertility of Soils*, 54(1), 1-10.
- Schwinning, S., Sala, O.E. (2004). Hierarchy of responses to resource pulses in arid and semi-arid ecosystems. *Oecologia*, 141(2), 211-220.
- Schwinning, S., Starr, B. I., Ehleringer, J. R. (2005). Summer and winter drought in a cold desert ecosystem (Colorado Plateau) part II: effects on plant carbon assimilation and growth. *Journal of Arid Environments*, 61(1), 61-78.
- Segueda, A. N., Correa, G. V., Blanco, J. L., Gamino, M. D. L. R. (2011). Naturaleza y utilidad de los indicadores de calidad del suelo. *ContactoS*, 80, 29-37.
- SENASA. (2017). SIGSA - Dirección de Control de Gestión y Programas Especiales - Dirección Nacional de Sanidad Animal - SENASA. [https://www.magyp.gob.ar/sitio/areas/d\\_ovinos/estadistica/existencias/\\_ovinas/2017.pdf](https://www.magyp.gob.ar/sitio/areas/d_ovinos/estadistica/existencias/_ovinas/2017.pdf)
- Serna-Chavez, H. M., Fierer, N., Bodegom, P. M. (2013). Global drivers and patterns of microbial abundance in soil. *Glob Ecol Biogeogr.* (22), 1162–1172.
- Shamir, I., Steinberger, Y. (2007). Vertical distribution and activity of soil microbial population in a sandy desert ecosystem. *Microbial ecology*, 53(2), 340-347.
- Siles, J.A., Margesin, R. (2016). Abundance and diversity of bacterial, archaeal, and fungal communities along an altitudinal gradient in alpine forest soils: what are the driving factors?. *Microbial ecology*, 72(1), 207-220.
- Singh, J. S., Raghubanshi, A. S., Singh, R. S., Srivastava, S. C. (1989). Microbial biomass acts as a source of plant nutrients in dry tropical forest and savanna. *Nature*, 338(6215), 499-500.
- Smith, S. E., Read, D. J. (1997). *Mycorrhizal Symbiosis*. Academic Press, London.
- Smith, S.E., Read, D.J., (2008). *Mycorrhizal Symbiosis*, third ed. Academic Press, London, pp. 1-787.
- Smith, S. E., Smith, F. A. (2011). Roles of arbuscular mycorrhizas in plant nutrition and growth: new paradigms from cellular to ecosystem scales. *Annual review of plant biology*, 62, 227-250.
- Smolander, A., Kurka, A., Kitunen, V., Mälikönen, E. (1994). Microbial biomass C and N, and respiratory activity in soil of repeatedly limed and N-and P-fertilized Norway spruce stands. *Soil Biology and Biochemistry*. 26(8): 957-962.
- Snellgrove, R. C., Splittstoesser, W. E., Stribley, D. P., Tinker, P. B. (1982). The distribution of carbon and the demand of the fungal symbiont in leek plants with vesicular-arbuscular mycorrhizas. *New Phytologist*. 92(1): 75-87.
- Söderström, B., Bååth, E., Lundgren, B. (1983). Decrease in soil microbial activity and biomasses owing to nitrogen amendments. *Canadian Journal of Microbiology*, 29(11), 1500-1506.
- Sorensen, P. O., Germino, M. J., Feris, K. P. (2013). Microbial community responses to 17 years of altered precipitation are seasonally dependent and coupled to co-varying effects of water content on vegetation and soil C. *Soil Biology and Biochemistry*, 64, 155-163.
- Soriano, A., Sala, O. (1983). Ecological strategies in a patagonian arid steppe. *Vegetation*. 56:9-15.
- Sparling, G. P. (1985). The soil biomass. In *Soil Organic Matter and Biological Activity* (D. Vaughan and R. E. Malcolm. Eds). *Developments in Plant and Soil Sciences* Vol. 16. pp. 223-262. Nijhoff, The Hague.

- Sparling, G.P. (1992). Ratio of microbial biomass carbon to soil organic carbon as a sensitive indicator of changes in soil organic matter. *Soil Research*, 30(2), 195-207.
- Spehn, E.M., Joshi, J., Schmid, B., Alphei, J., Körner, C. (2000). Plant diversity effects on soil heterotrophic activity in experimental grassland ecosystems. *Plant Soil* 224, 217–230.
- Spohn, M. (2015). Microbial respiration per unit microbial biomass depends on litter layer carbon-to-nitrogen ratio. *Biogeosciences*, 12(3), 817-823.
- Spohn, M., Pötsch, E. M., Eichorst, S. A., Woebken, D., Wanek, W., Richter, A. (2016). Soil microbial carbon use efficiency and biomass turnover in a long-term fertilization experiment in a temperate grassland. *Soil Biology and Biochemistry*, 97, 168-175.
- Stark, S., Grellmann, D. (2002). Soil microbial responses to herbivory in an arctic tundra heath at two levels of nutrient availability. *Ecology*. 83(10): 2736-2744.
- Steffens, M., Kolbl, A., Totsche, K.U., Kogel-Knabner, I. (2008). Grazing effects on soil chemical and physical properties in a semiarid steppe of Inner Mongolia (PR China). *Geoderma*, 143, 63– 72.
- Stevenson, B. A., Sarmah, A. K., Smernik, R., Hunter, D. W., Fraser, S. (2016). Soil carbon characterization and nutrient ratios across land uses on two contrasting soils: Their relationships to microbial biomass and function. *Soil Biology and Biochemistry*, 97, 50-62.
- Strecker, T., Barnard, R. L., Niklaus, P. A., Scherer-Lorenzen, M., Weigelt, A., Scheu, S., Eisenhauer, N. (2015). Effects of plant diversity, functional group composition, and fertilization on soil microbial properties in experimental grassland. *PloS one*, 10(5), e0125678.
- Sun, X., Shi, J., Ding, G. (2017). Combined effects of arbuscular mycorrhiza and drought stress on plant growth and mortality of forage sorghum. *Applied Soil Ecology*, 119, 384-391.
- Sun, Y., Zhang, Y., Feng, W., Qin, S., Liu, Z., Bai, Y., Yan, R., Fa, K. (2017). Effects of xeric shrubs on soil microbial communities in a desert in northern China. *Plant and soil*, 414(1-2), 281-294.
- Sylvia, D.M., Fuhrmann, J.J., Hartel, P.G., Zuberer, D.A. (2005). Principles and applications of soil microbiology, Second ed. Pearson Education, Upper Saddle River, New Jersey.
- Tardieu, F., Granier, C., Muller, B. (1999). Modelling leaf expansion in a fluctuating environment: are changes in specific leaf area a consequence of changes in expansion rate?. *The New Phytologist*, 143(1), 33-43.
- Teague, W. R., Dowhower, S. L., Baker, S. A., Haile, N., DeLaune, P. B., Conover, D. M. (2011). Grazing management impacts on vegetation, soil biota and soil chemical, physical and hydrological properties in tall grass prairie. *Agriculture, ecosystems & environment*, 141(3-4), 310-322.
- Tedersoo, L., Bahram, M., Zobel, M. (2020). How mycorrhizal associations drive plant population and community biology. *Science*, 367(6480).
- Tester, M., Smith, S. E., Smith, F. A. (1987). The phenomenon of "nonmycorrhizal" plants. *Canadian journal of botany*, 65(3), 419-431.
- Thakur, M. P., Milcu, A., Manning, P., Niklaus, P. A., Roscher, C., Power, S., Guo, H. (2015). Plant diversity drives soil microbial biomass carbon in grasslands irrespective of global environmental change factors. *Global change biology*, 21(11), 4076-4085.

- Tibbett, M., Sanders, F., Cairney, J. (2002). Low-temperature-induced changes in trehalose, mannitol and arabitol associated with enhanced tolerance to freezing in ectomycorrhizal basidiomycetes (*Hebeloma* spp.). *Mycorrhiza*, 12(5), 249-255.
- Tommerup, I. C. (1983). Temperature relations of spore germination and hyphal growth of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in soil. *Transactions of the British Mycological Society*, 81(2), 381-387.
- Tongway, D. J., Ludwig, J. A. (1997). The nature of landscape dysfunction in rangelands. In: Ludwig, J., Tongway, D., Freudenberger, D., Noble, J., Hodgkinson, K. (Eds.), *Landscape Ecology, Function and Management: Principles from Australia's Rangelands*. CSIRO Publishing, Collingwood, pp. 49-61.
- Torres, Y. A., Busso, C., Montenegro, O., Ithurrt, L., Giorgetti, H., Rodríguez, G., Baioni, S. (2011). Defoliation effects on the arbuscular mycorrhizas of ten perennial grass genotypes in arid Patagonia, Argentina. *Applied soil ecology*, 49, 208-214.
- Tracy, B. F., Frank, D. A. (1998). Herbivore influence on soil microbial biomass and nitrogen mineralization in a northern grassland ecosystem: Yellowstone National Park. *Oecologia*. 114(4): 556-562.
- Trasar, M. C., Leirós, M. C., Gil, F. (2000). Biochemical properties of acid soils under climax vegetation (Atlantic oakwood) in an area of the European temperate-humid zone (Galicia, NW Spain): specific parameters. *Soil Biology & Biochemistry* 32: 747-755.
- Treseder, K. K., Vitousek, P. M. (2001). Effects of soil nutrient availability on investment in acquisition of N and P in Hawaiian rain forests. *Ecology*, 82(4), 946-954.
- Treseder, K. K. (2008). Nitrogen additions and microbial biomass: A meta-analysis of ecosystem studies. *Ecology letters*, 11(10), 1111-1120.
- Trinchera, A., Pinzari, F., Benedetti, A. (2001). Should we be able to define soil quality before "restoring" it? Use of soil quality indicators in Mediterranean ecosystems. *Minerva Biotecnologica*, 13(1), 13.
- Truu, M., Truu, J., Ivask, M. (2008). Soil microbiological and biochemical properties for assessing the effect of agricultural management practices in Estonian cultivated soils. *European Journal of soil biology*, 44(2), 231-237.
- Tucker, C.L., Bell, J., Pendall, E., Ogle, K. (2013). Does declining carbon-use efficiency explain thermal acclimation of soil respiration with warming? *Global Change Biology* 19, 252e263.
- Tuomi, J., Kytöviita, M. M., Härdling, R. (2001). Cost efficiency of nutrient acquisition and the advantage of mycorrhizal symbiosis for the host plant. *Oikos*, 92(1), 62-70.
- Uhlířová, E., Elhottova, D., Tříska, J., Šantrůčková, H. (2005). Physiology and microbial community structure in soil at extreme water content. *Folia microbiologica*, 50(2), 161.
- van der Heyde, M., Bennett, J.A., Pither, J., Hart, M. (2017). Longterm effects of grazing on arbuscular mycorrhizal fungi. *Agric. Ecosyst. Environ.*
- van Leeuwen, J. P., Saby, N. P. A., Jones, A., Louwagie, G., Micheli, E., Rutgers, M., Creamer, R. E. (2017). Gap assessment in current soil monitoring networks across Europe for measuring soil functions. *Environmental Research Letters*, 12(12), 124007.
- Van Veen, J. A., Merckx, R., Van De Geijn, S. C. (1989). Plant-and soil related controls of the flow of carbon from roots through the soil microbial biomass. *Plant and Soil*. 115 (2): 179-188.



- Vance, E.D., Brookes, P.C., Jenkinson, D.S. (1987). An extraction method for measuring soil microbial biomass C. *Soil biology and Biochemistry*, 19(6), 703-707.
- Vandenkoornhuyse, P., Ridgway, K. P., Watson, I. J., Fitter, A. H., Young, J. P. W. (2003). Co-existing grass species have distinctive arbuscular mycorrhizal communities. *Molecular Ecology*, 12(11), 3085-3095.
- Vasconcellos, R. L., Bonfim, J. A., Baretta, D., Cardoso, E. J. (2016). Arbuscular mycorrhizal fungi and glomalin-related soil protein as potential indicators of soil quality in a recuperation gradient of the Atlantic forest in Brazil. *Land Degradation & Development*, 27(2), 325-334.
- Vásquez, E., Dávila Zúñiga, D. (2008). Efecto de la humedad, temperatura y pH del suelo en la actividad microbiana a nivel de laboratorio. *Ecología Aplicada*. 7(1-2): 123-130.
- Velázquez, M. S., Stürmer, S. L., Bruzone, C., Fontenla, S., Barrera, M., Cabello, M. (2016). Occurrence of arbuscular mycorrhizal fungi in high altitude sites of the Patagonian Altoandina region in Nahuel Huapi National Park (Argentina). *Acta Botanica Brasilica*, 30(4), 521-531.
- Vitousek, P. M., Howarth, R. W. (1991). Nitrogen limitation on land and sea: how can it occur? *Biogeochemistry* 13:87–115
- Waddell, H. A., Simpson, R. J., Ryan, M. H., Lambers, H., Garden, D. L., Richardson, A. E. (2017). Root morphology and its contribution to a large root system for phosphorus uptake by *Rytidosperma* species (wallaby grass). *Plant and soil*, 412(1-2), 7-19.
- Wagener, S. M., Schimel, J. P. (1998). Stratification of soil processes: a study of the birch forest floor in the Alaskan taiga. *Oikos* 81: 63-74.
- Walling, S.Z., Zabinski, C. (2006). Defoliation effects on arbuscular mycorrhizae and plant growth of two native bunchgrasses and an invasive forb. *Appl. Soil Ecol.* 32, 111–117.
- Wang, K. H., Mcorley, R., Bohlen, P., Gathumbi, S. M. (2006). Cattle grazing increases microbial biomass and alters soil nematode communities in subtropical pastures. *Soil Biology & Biochemistry* 38: 1956-1965.
- Wang, W., Zeng, W., Chen, W., Zeng, H., Fang, J. (2013). Soil respiration and organic carbon dynamics with grassland conversions to woodlands in temperate China. *PloS one*, 8(8), e71986.
- Wang, Z., Ji, L., Hou, X., Schellenberg, M. P. (2016). Soil respiration in semiarid temperate grasslands under various land management. *Plos One*, 11(1), e0147987.
- Wang, Q., Zhang, W., Sun, T., Chen, L., Pang, X., Wang, Y., Xiao, F. (2017). N and P fertilization reduced soil autotrophic and heterotrophic respiration in a young *Cunninghamia lanceolata* forest. *Agricultural and Forest Meteorology*, 232, 66-73.
- Wardle, D. A. (1998). Controls of temporal variability of the soil microbial biomass: a global-scale synthesis. *Soil Biology and Biochemistry*. 30(13): 1627-1637.
- Wardle, D. A., Ghani, A. (2018). A tale of two theories, a chronosequence and a bioindicator of soil quality. *Soil Biology and Biochemistry*, 121, A3-A7.
- Waters, J. R., Borowicz V. A. (1994). Effect of clipping, benomyl, and genet on 14 C transfer between mycorrhizal plants. *Oikos*. 246-252.
- Weber, C.F., Vilgalys, R., Kuske, C.R. (2013). Changes in fungal community composition in response to elevated atmospheric CO<sub>2</sub> and nitrogen fertilization varies with soil horizon. *Frontiers in Microbiology*, 4, 78.

- Wei, H., Guenet, B., Vicca, S., Nunan, N., AbdElgawad, H., Pouteau, V., Janssens, I. A. (2014). Thermal acclimation of organic matter decomposition in an artificial forest soil is related to shifts in microbial community structure. *Soil Biology and Biochemistry*, 71, 1-12. doi: 10.1016/j.soilbio.2014.01.003
- Weltzin, J. F., Loik, M. E., Schwinning, S., Williams, D. G., Fay, P. A., Haddad, B. M., Pockman, W. T. (2003). Assessing the response of terrestrial ecosystems to potential changes in precipitation. *Bioscience*, 53(10), 941-952
- Wienhold, B.J., Hendrickson, J.R., Karn, J.F. (2001). Pasture management influences on soil properties in the Northern Great Plains. *Journal of Soil and Water Conservation*, 56(1), 27-31.
- Willatt, S. T., Pullar, D. M. (1983). Changes in soil physical properties under grazed pastures. *Aust. J. Soil Res.* 22: 343- 348.
- Williams, M. A. (2007). Response of microbial communities to water stress in irrigated and drought-prone tallgrass prairie soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 39(11), 2750-2757.
- Wolfe, B. E., Parrent, J. L., Koch, A. M., Sikes, B. A., Gardes, M., Klironomos, J. N. (2009). Spatial heterogeneity in mycorrhizal populations and communities: scales and mechanisms. In *Mycorrhizas-Functional Processes and Ecological Impact* (pp. 167-185). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Wu, Z., Dijkstra, P., Koch, G. W., Peñuelas, J., Hungate, B. A. (2011). Responses of terrestrial ecosystems to temperature and precipitation change: A meta-analysis of experimental manipulation. *Global Change Biology*, 17(2), 927-942.
- Xie, G., Steinberger, Y. (2001). Temporal patterns of C and N under shrub canopy in a loessial soil desert ecosystem. *Soil Biology and Biochemistry*, 33(10), 1371-1379.
- Xu, W., Wan, S. (2008). Water-and plant-mediated responses of soil respiration to topography, fire, and nitrogen fertilization in a semiarid grassland in northern China. *Soil Biology and Biochemistry*, 40(3), 679-687.
- Xu, X., Thornton, P. E., Post, W. M. (2013). A global analysis of soil microbial biomass carbon, nitrogen and phosphorus in terrestrial ecosystems. *Global Ecology and Biogeography*, 22(6), 737-749.
- Xu, X., Shi, Z., Li, D., Zhou, X., Sherry, R. A., Luo, Y. (2015). Plant community structure regulates responses of prairie soil respiration to decadal experimental warming. *Global Change Biology*, 21(10), 3846-3853.
- Xu, W., Yuan, W. (2017). Responses of microbial biomass carbon and nitrogen to experimental warming: a meta-analysis. *Soil Biology and Biochemistry*, 115, 265-274.
- Xu, X., Schimel, J.P., Janssens, I.A., Song, X., Song, C., Yu, G., Thornton, P.E. (2017). Global pattern and controls of soil microbial metabolic quotient. *Ecological Monographs*, 87(3), 429-441.
- Yahdjian, L., Sala, O. E. (2002). A rainout shelter design for intercepting different amounts of rainfall. *Oecologia*, 133(2), 95-101.
- Yang, W., Zheng, Y., Gao, C., He, X., Ding, Q., Kim, Y., Guo, L. D. (2013). The arbuscular mycorrhizal fungal community response to warming and grazing differs between soil and roots on the Qinghai-Tibetan Plateau. *PLoS One*, 8(9), e76447.
- Yang, X., Chen, J., Shen, Y., Dong, F., Chen, J. (2020). Global negative effects of livestock grazing on arbuscular mycorrhizas: A meta-analysis. *Science of The Total Environment*, 708, 134553.
- Yeates G. W., Sagar S. (1998). Comparison of soil microbial properties and fauna under tussock-grassland and pine plantation. *J Roy Soc New Zeal* 28: 523–535.

- Yuste, J. C., Penuelas, J., Estiarte, M., Garcia-Mas, J., Mattana, S., Ogaya, R., Sardans, J. (2011). Drought-resistant fungi control soil organic matter decomposition and its response to temperature. *Global Change Biology*, 17(3), 1475-1486.
- Zeng, X., Zhang, W., Shen, H., Cao, J., Zhao, X. (2014). Soil respiration response in different vegetation types at Mount Taihang, China. *Catena*, 116, 78-85.
- Zhao, C., Miao, Y., Yu, C., Zhu, L., Wang, F., Jiang, L., Wan, S. (2016). Soil microbial community composition and respiration along an experimental precipitation gradient in a semiarid steppe. *Scientific reports*, 6(1), 1-9.
- Zhao, F., Ren, C., Shelton, S., Wang, Z., Pang, G., Chen, J., Wang, J. (2017). Grazing intensity influence soil microbial communities and their implications for soil respiration. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 249, 50-56.
- Zhao, Y., Liu, Z., Wu, J. (2020). Grassland ecosystem services: A systematic review of research advances and future directions. *Landscape Ecology*, 1-22.
- Zheng, Z. M., Yu, G. R., Fu, Y. L., Wang, Y. S., Sun, X. M., Wang, Y. H. (2009). Temperature sensitivity of soil respiration is affected by prevailing climatic conditions and soil organic carbon content: A trans-China based case study. *Soil Biology and Biochemistry*, 41(7), 1531-1540.
- Zhong, W., Gu, T., Wang, W., Zhang, B., Lin, X., Huang, Q., Shen, W. (2010). The effects of mineral fertilizer and organic manure on soil microbial community and diversity. *Plant and soil*. 326(1-2): 511-522.
- Zhou, Z. C., Gan, Z. T., Shanguan, Z. P., Dong, Z. B. (2010). Effects of grazing on soil physical properties and soil erodibility in semiarid grassland of the Northern Loess Plateau (China). *Catena*, 82(2), 87-91.
- Zhou, X., Zhou, L., Nie, Y., Fu, Y., Du, Z., Shao, J., Wang, X. (2016). Similar responses of soil carbon storage to drought and irrigation in terrestrial ecosystems but with contrasting mechanisms: A meta-analysis. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 228, 70-81.
- Zhou, G., Zhou, X., He, Y., Shao, J., Hu, Z., Liu, R., Hosseinibai, S. (2017). Grazing intensity significantly affects belowground carbon and nitrogen cycling in grassland ecosystems: a meta-analysis. *Global change biology*, 23(3), 1167-1179.
- Zhou, L., Li, H., Shen, H., Xu, Y., Wang, Y., Xing, A., Fang, J., (2017). Shrub-encroachment induced alterations in input chemistry and soil microbial community affect topsoil organic carbon in an Inner Mongolian grassland. *Biogeochemistry*, 136(3), 311-324.
- Zhu, B., Panke-Buisse, K., Kao-Kniffin, J. (2015). Nitrogen fertilization has minimal influence on rhizosphere effects of smooth crabgrass (*Digitaria ischaemum*) and bermudagrass (*Cynodon dactylon*). *J Plant Ecol* 8:390–400.
- Zhu, C., Ma, Y., Wu, H., Sun, T., La Pierre, K. J., Sun, Z., Yu, Q. (2016). Divergent effects of nitrogen addition on soil respiration in a semiarid grassland. *Scientific reports*, 6, 33541.
- Zobel, M., Moora, M., Haukioja, E. (1997). Plant coexistence in the interactive environment: arbuscular mycorrhizae should not be out of mind. *Oikos* 78: 202–206.
- Zou, C., Wang, K., Wang, T., Xu, W. (2007). Overgrazing and soil carbon dynamics in eastern Inner Mongolia of China. *Ecological Research*, 22(1), 135-142.